

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Consumo voluntario de forrajes ricos en compuestos secundarios: efecto sobre la producción de metano entérico, fermentación ruminal y síntesis de proteína microbiana en ovinos**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Ramón Gonzalo Aragadvay Yungán**

**Director**

**Marcos Antonio Barros Rodríguez**

**Madrid**

**© Ramón Gonzalo Aragadvay Yungán, 2020**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Producción Animal**



**TESIS DOCTORAL**

**Consumo voluntario de forrajes ricos en compuestos secundarios; efecto sobre la  
producción de metano entérico, fermentación ruminal y síntesis de proteína  
microbiana en ovinos**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR PRESENTADA POR**

**Ramón Gonzalo Aragadvay Yungán**

**Director**

**Marcos Antonio Barros Rodríguez**

**Madrid, 2019**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Producción Animal**



**CONSUMO VOLUNTARIO DE FORRAJES RICOS EN COMPUESTOS  
SECUNDARIOS; EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO ENTÉRICO,  
FERMENTACIÓN RUMINAL Y SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA EN  
OVINOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Ramón Gonzalo Aragadvay Yungán**

Bajo la dirección del Doctor:

Marcos Antonio Barros Rodríguez

**Madrid, 2019**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**TESIS DOCTORAL**

**CONSUMO VOLUNTARIO DE FORRAJES RICOS EN COMPUESTOS  
SECUNDARIOS; EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO ENTÉRICO,  
FERMENTACIÓN RUMINAL Y SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA EN  
OVINOS**

**Ramón Gonzalo Aragadvay Yungán**

**Madrid, noviembre del 2019**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**TESIS DOCTORAL**

**CONSUMO VOLUNTARIO DE FORRAJES RICOS EN COMPUESTOS  
SECUNDARIOS; EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO ENTÉRICO,  
FERMENTACIÓN RUMINAL Y SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA EN  
OVINOS**

**Memoria presentada por el Licenciado en Zootecnia  
Ramón Gonzalo Aragadvay Yungán para optar al grado  
de Doctor en Veterinaria**

**Madrid, noviembre del 2019**





## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña. **Ramón Gonzalo Aragadvay Yungán**,  
estudiante en el Programa de Doctorado en **Veterinaria**,  
de la Facultad de **Veterinaria** de la Universidad Complutense de Madrid, como autor/a de la  
tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada: **Consumo voluntario de  
forrajes ricos en compuestos secundarios; efecto sobre la producción de metano entérico,  
fermentación ruminal y síntesis de proteína microbiana en ovinos**  
y dirigida por: **Dr. Marcos Antonio Barros Rodríguez**

### DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 30 de octubre de 2019

Fdo.: 

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera  
página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.





**Dr. Luis Tomás Ortiz Vera**, Profesor Titular del Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y **Dr. Marcos Antonio Barros Rodríguez**, Profesor Titular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

**CERTIFICAN:** Que la presente Memoria de Tesis Doctoral titulada: “Consumo voluntario de forrajes ricos en compuestos secundarios; efecto sobre la producción de metano entérico, fermentación ruminal y síntesis de proteína microbiana en ovinos”, del que es autor el Licenciado en Zootecnia **Dn. Ramón Gonzalo Aragadvay Yungán**, ha sido realizada bajo su dirección conjunta, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Para que conste, firman la presente en Madrid, a 30 de octubre del 2019.

Fdo.: Luis Ortiz V.

Fdo.: Marcos A. Barros R

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, agradezco a Dios, el ser supremo que ha guiado mi vida hasta este momento.

Un profundo agradecimiento a la Universidad Técnica de Ambato (UTA) que a través de la Dirección de Relaciones Nacionales e Internacionales (DIRENI) y su programa de becas y ayudas económicas para capacitación, perfeccionamiento y formación docente, se me otorgó la beca para mis estudios en el programa de Doctorado en Veterinaria en la Universidad Complutense de Madrid.

De igual forma, quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Luis Ortiz que, en calidad de Tutor, que me supo recibir y me ayudó para que mis estancias doctorales cumplan con mis objetivos propuestos.

A Marcos Barros, que como mi Director de tesis colaboró desinteresadamente en el desarrollo de mis ensayos en campo y laboratorio en Ecuador.

A Ma. Dolores Carro, por ayudarme a desarrollar parte de mis análisis en el laboratorio de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria, Agroalimentaria y de Biosistemas-UPM.

A Carlos Navarro y Jairo García compañeros de laboratorio que con mucho afán me colaboraron en el desarrollo de mis experimentos.

Como no agradecer a mi Esposa Gaby, gracias por tu ayuda incondicional y entender mis ausencias.

A mis hermanos: Oscar, Sandra, Marisol, Silvia, Susanita y Benjamín, que han estado pendientes de mí a pesar de la distancia y los llevo siempre en mis pensamientos.

A Diana y su madre que fueron la primera familia que me acogió en España.

A Verónica y su familia que me permitieron convivir en su cálido hogar e hicieron que mi estancia sea más agradable.

A todos ustedes: Gracias de corazón

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi familia, especialmente a mis padres que la vida ha permitido afortunadamente tenerles en mi camino y que han estado siempre en mi corazón durante mi permanencia en España.

## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESUMEN.....</b>                                     | <b>16</b> |
| <b>SUMMARY.....</b>                                     | <b>19</b> |
| <b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....</b>                    | <b>23</b> |
| <b>CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....</b>          | <b>27</b> |
| 2.1. METABOLITOS SECUNDARIOS EN PLANTAS.....            | 27        |
| 2.1.1. Taninos.....                                     | 27        |
| 2.1.2. Saponinas.....                                   | 30        |
| 2.2. FUNCIÓN RUMINAL.....                               | 31        |
| 2.2.1. Fermentación ruminal.....                        | 32        |
| 2.2.2. Producción de metano en el rumen.....            | 33        |
| 2.2.3. Degradación ruminal de los carbohidratos.....    | 34        |
| 2.2.4. Metabolismo ruminal de los carbohidratos.....    | 38        |
| 2.2.5. Balance de la fermentación ruminal.....          | 41        |
| 2.2.6. Degradación ruminal de las proteínas.....        | 42        |
| 2.2.7. Metabolismo ruminal de las proteínas.....        | 43        |
| 2.2.8. Síntesis de proteína microbiana.....             | 44        |
| 2.2.9. Metabolismo ruminal de los lípidos.....          | 46        |
| 2.3. LEGUMINOSAS ARBÓREAS Y ARSUSTIVAS DEL ECUADOR..... | 48        |
| 2.3.1. <i>Clitoria arborea</i> .....                    | 49        |
| 2.3.2. <i>Erythrina fusca</i> .....                     | 50        |
| 2.3.3. <i>Bauhinia forficata</i> .....                  | 51        |
| 2.3.4. <i>Erythrina poeppigiana</i> .....               | 52        |
| 2.3.5. <i>Cratylia argentea</i> .....                   | 52        |
| 2.3.6. <i>Gliricidia sepium</i> .....                   | 53        |
| 2.3.7. <i>Cassia tora</i> .....                         | 54        |
| 2.3.8. <i>Flemingia macrophylla</i> .....               | 55        |
| 2.3.9. <i>Acacia dealbatha</i> .....                    | 57        |
| 2.3.10. <i>Acacia melanoxylon</i> .....                 | 57        |
| 2.3.11. <i>Albizia lophantha</i> .....                  | 58        |
| 2.3.12. <i>Lupinus pubescens</i> .....                  | 59        |
| 2.3.13. <i>Inga insignis</i> .....                      | 60        |
| 2.3.14. <i>Senna multiglandulosa</i> .....              | 61        |
| 2.3.15. <i>Tecoma stans</i> .....                       | 62        |
| <b>CAPÍTULO 3. OBJETIVOS Y ESQUEMA DE TESIS.....</b>    | <b>65</b> |
| 3.1. OBJETIVO GENERAL.....                              | 65        |
| 3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....                           | 65        |
| <b>CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>            | <b>67</b> |
| 4.1. METODOLOGÍA OBJETIVO 1.....                        | 67        |
| 4.2. METODOLOGÍA OBJETIVO 2.....                        | 68        |
| 4.3. METODOLOGÍA OBJETIVO 3.....                        | 70        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>   | <b>73</b>  |
| 5.1. INFLUENCIA POTENCIAL DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS<br>TROPICALES SOBRE LAS ACTIVIDADES DE FERMENTACIÓN<br>RUMINAL Y MITIGACIÓN DEL METANO.....        | 74         |
| 5.2. LEGUMINOSAS ARBÓREAS DE CLIMA TEMPLADO: EFECTO<br>SOBRE LA MITIGACIÓN DE METANO ENTÉRICO Y FERMENTACIÓN<br>RUMINAL <i>IN VITRO</i> .....          | 85         |
| 5.3. EFICIENCIA DE <i>Acacia melanoxylon</i> EN DIETAS PARA OVINOS<br>SOBRE LA REDUCCIÓN DE LA METANOGÉNESIS Y SÍNTESIS DE<br>PROTEÍNA MICROBIANA..... | 94         |
| <b>CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES FINALES.....</b>   | <b>106</b> |
| <b>CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFIA.....</b>   | <b>108</b> |

## INDICE DE TABLAS

|                  |  |            |
|------------------|--|------------|
| <b>Tabla 1.</b>  | Leguminosas arbóreas y arbustivas de clima tropical utilizadas en la alimentación de ganado en Ecuador.....  | <b>49</b>  |
| <b>Tabla 2.</b>  | Leguminosas arbóreas y arbustivas de clima frío utilizadas en la alimentación del ganado en Ecuador.....   | <b>56</b>  |
| <b>Tabla 3.</b>  | Composición química de diferentes leguminosas de clima tropical expresadas en g / kg <sup>-1</sup> de materia seca.....  | <b>77</b>  |
| <b>Tabla 4.</b>  | Parámetros de cinética de producción de gas <i>in vitro</i> y degradabilidad efectiva de la materia seca (DEMS) de leguminosas de árboles de clima tropical.....                         | <b>80</b>  |
| <b>Tabla 5.</b>  | Producción de gas y metano entérico (CH <sub>4</sub> ), hidrógeno neto (H <sub>2</sub> ), relación molar de ácidos grasos volátiles de leguminosas forrajeras de clima tropical..        | <b>82</b>  |
| <b>Tabla 6.</b>  | Coefficientes de correlación (r) entre valor nutritivo, AGV, H <sub>2</sub> neto, DEMS y producción de gas y metano entérico de leguminosas de clima tropical.....                       | <b>84</b>  |
| <b>Tabla 7.</b>  | Composición química de diferentes leguminosas arbóreas de clima templado expresado como g/kg <sup>-1</sup> de materia seca.....  | <b>90</b>  |
| <b>Tabla 8.</b>  | Parámetros de producción de gas y metano entérico de leguminosas arbórea de clima templado.....  | <b>91</b>  |
| <b>Tabla 9.</b>  | Ácidos grasos volátiles, nitrógeno amoniacal, degradación efectiva de la materia seca y digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca de leguminosas arbóreas de clima templado..... | <b>92</b>  |
| <b>Tabla 10.</b> | Coefficientes de correlación de Pearson entre el contenido de compuestos secundarios y la producción de gas, metano y función ruminal de leguminosas arbóreas de clima templado.....     | <b>92</b>  |
| <b>Tabla 11.</b> | Composición química en base a materia seca de los tratamientos experimentales.....   | <b>96</b>  |
| <b>Tabla 12.</b> | Comportamiento productivo, consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de ovinos alimentados con dietas con diferentes niveles de inclusión de <i>A. melanoxydon</i> .....         | <b>99</b>  |
| <b>Tabla 13.</b> | Estimación del metano producido y ácidos grasos volátiles en líquido ruminal de ovinos alimentados con dietas con diferentes niveles de inclusión de <i>A. melanoxydon</i> .....         | <b>101</b> |
| <b>Tabla 14.</b> | Balance de nitrógeno y aporte de N-microbial en ovinos alimentados con dietas con diferentes niveles de inclusión de <i>A. melanoxydon</i> .....   | <b>102</b> |

## INDICE DE FIGURAS

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| <b>Figura 1</b>  | Estructura de tanino hidrolizable (Castalagina).....  | <b>27</b> |
| <b>Figura 2</b>  | Estructura de tanino condensado ( <i>Sorghum procyanidin</i> ).....                                   | <b>28</b> |
| <b>Figura 3</b>  | Estructura de saponinas triterpena y esteroidea.....  | <b>31</b> |
| <b>Figura 4</b>  | Esquema de fermentación de los carbohidratos en los forrajes.....                                     | <b>37</b> |
| <b>Figura 5</b>  | Vías del metabolismo de los carbohidratos en el rumen.....  | <b>39</b> |
| <b>Figura 6</b>  | Síntesis de metano para regenerar cofactor oxidado (NAD).....   | <b>41</b> |
| <b>Figura 7</b>  | <i>Clitoria arborea</i> .....   | <b>50</b> |
| <b>Figura 8</b>  | <i>Erythrina fusca</i> .....  | <b>50</b> |
| <b>Figura 9</b>  | <i>Bauhinia forficata</i> .....   | <b>51</b> |
| <b>Figura 10</b> | <i>Erythrina poeppigiana</i> .....  | <b>52</b> |
| <b>Figura 11</b> | <i>Cratylia argentea</i> .....  | <b>53</b> |
| <b>Figura 12</b> | <i>Gliricidia sepium</i> .....  | <b>54</b> |
| <b>Figura 13</b> | <i>Cassia tora</i> .....  | <b>55</b> |
| <b>Figura 14</b> | <i>Flemingia macrophylla</i> .....  | <b>56</b> |
| <b>Figura 15</b> | <i>Acacia dealbata</i> .....  | <b>57</b> |
| <b>Figura 16</b> | <i>Acacia melanoxylon</i> .....   | <b>58</b> |
| <b>Figura 17</b> | <i>Albizia lophantha</i> .....  | <b>59</b> |
| <b>Figura 18</b> | <i>Lupinus pubescens</i> .....  | <b>60</b> |
| <b>Figura 19</b> | <i>Inga insignis</i> .....  | <b>61</b> |
| <b>Figura 20</b> | <i>Senna multiglandulosa</i> .....  | <b>62</b> |
| <b>Figura 21</b> | <i>Tecoma stans</i> .....   | <b>63</b> |
| <b>Figura 22</b> | Recolección de hojas de leguminosas arbóreas y arbustivas.....  | <b>67</b> |
| <b>Figura 23</b> | Medición de la producción de gas <i>in vitro</i> .....  | <b>69</b> |
| <b>Figura 24</b> | Curvas de producción de gas de leguminosas arbóreas sometidas a diferentes tiempos de incubación..... | <b>91</b> |



## RESUMEN

El primero objetivo del proyecto fue evaluar la influencia de forrajes de árboles tropicales sobre la producción de gas y metano entérico, degradación efectiva y digestibilidad real *in vitro*. La producción de metano, AGV y N-NH<sub>3</sub> se midió a las 24 horas de incubación. Las leguminosas arbóreas evaluadas fueron: *Clitoria arbórea*, *Erytrina fusca*, *Bauhinia forficata*, *Erytrina poeppigiana*, *Cratylia argentea*, *Glirycidia sepium*, *Cassia tora*, y *Flemingia macrophylla*. Se utilizó líquido ruminal de cuatro ovejas adultas (PV: 81.8 ± 3.33 kg) fistuladas con cánulas permanentes en el rumen. La producción de gas se midió desde las 3 hasta las 120 horas de incubación. Los parámetros de producción de gas *in vitro* fueron menores ( $P < 0.05$ ) en la *C. arbórea* ( $A = 41.68$  mL gas/g MS;  $c = 0.044$  %/h y  $Lag = 1.654$  h). El ritmo medio de producción de gas para *B. forficata* fue de 1.017 mL/g MS ( $p < 0.05$ ). *C. arbórea* presentó una mayor ( $p = 0.0001$ ) degradación efectiva de la MS (40.461 g/kg) y una digestibilidad real de MS (82.517 g/kg) frente a los demás forrajes. Con respecto a los AGV la mayor ( $P < 0.05$ ) proporción de acético, propiónico y butírico se observó en *C. arbórea*, *G. sepium* y *E. poeppigiana* (72.52, 23.09 y 7.44 mol/100 mol respectivamente) y el menor ( $P = 0.0001$ ) ratio acético/propiónico se observó en *G. sepium* (2.92 mol/100 mol). El contenido de N-NH<sub>3</sub> (mg/L) no mostró diferencias. La menor producción de metano ( $p = 0.0001$ ) se observó en *C. arbórea* (1.23 mL CH<sub>4</sub>/g MS). *C. arborea* y *Cassia tora* presentaron mayor potencial en la reducción de metano entérico y modulación ruminal.

En la segunda parte del proyecto se evaluó el efecto de leguminosas adaptadas a clima templado sobre cinética de producción de gas, metano entérico y fermentación ruminal *in vitro*. Las especies estudiadas fueron *Acacia dealbatha*, *Acacia melanoxylon*, *Albizia lophantha*, *Lupinus pubescens*, *Inga insignes*, *Senna multiglandulosa* y *Tecoma stans*. Se estimó la degradación efectiva de la materia seca, la producción de gas *in vitro* se midió hasta las 120 horas de incubación, la producción de metano entérico, AGV's y amoníaco se midieron a las 24 horas.

Se valoró la materia seca, materia orgánica, cenizas, proteína cruda, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y lignina ácido detergente. Se cuantificó el contenido de fenoles totales y taninos condensados. Para determinar la digestibilidad las muestras se incubaron hasta las 120 horas. *I. insignes* presentó un mayor contenido de materia seca, y alto contenido de proteína bruta. *L. pubescens* presentó una baja digestibilidad de materia seca. El contenido de fibra detergente neutra fue mayor en *I. insignes* y con un valor superior en digestibilidad de materia seca y menor contenido de fenoles totales y taninos condensados. Mientras que *S. multiglandulosa* mostró bajo contenido de fibra ácida detergente. El valor de lignina ácida detergente fue superior en *I. insignes* y menor en *L. pubescens*. La producción de gas *in vitro* y metano entérico fue superior en *L. pubescens*. El ácido propiónico y amoníaco fueron superiores en *S. multiglandulosa*. Se concluye que la cantidad de compuestos secundarios afecta a la producción de metano, comprometen la digestibilidad y cinética ruminal de las leguminosas estudiadas.

En la tercera parte de la investigación, se evaluó la inclusión de *A. melanoxylon* incluidas al 15% (T1) y 30% (T2) en dietas para ovinos comparadas con un tratamiento control (T0). Las variables a medir fueron comportamiento productivo, consumo voluntario, producción de metano y aporte de proteína microbiana. El comportamiento productivo de los diferentes tratamientos. T1 y T2 fueron superiores estadísticamente ( $p = 0.0288$ ) a T0 para la ganancia diaria de peso. El consumo voluntario de materia seca y materia orgánica fue superior en T1 y T2 ( $p = 0.0002$ ) al compararlas

con T0. Mientras que el consumo voluntario de FDN y FDA fue mayor ( $p<.0001$ ) para T2 (442.00 g/kg MS y 97.71 g/kg MS respectivamente) con respecto a T1 y T0. El consumo de MS y MO digestibles mostraron diferencias significativas ( $p=0.0017$  y  $p=0.0025$  respectivamente) en T2 y T1 en comparación a T0.

Finalmente, el consumo de FND digestible, fue de 218.88 g/kg MS para T2 ( $p<.0001$ ), mostrando una concordancia con su digestibilidad que tuvo un valor de 502.67 g/kg MS ( $p=0.0002$ ), en los dos casos fueron superiores en relación a T0 y T1. La producción de metano ruminal por día (tabla 5), fue menor ( $p=0.0004$ ) para T0 (2.20 mol/d), en contraste a T1 y T2. No se encontró diferencias significativas en cuanto a las pérdidas de energía como metano ni cambios en el pH ruminal en los animales utilizados. La concentración de los AGV en el líquido ruminal recolectado, no se evidenció cambios en los diferentes tratamientos, pero si existió diferencias significativas ( $p=0.0338$ ) en la relación acético: propiónico, al comparar T1 (3.17) con los demás tratamientos. En lo que se refiere al balance de nitrógeno, se observó una disminución del contenido del N en orina de los animales correspondientes al tratamiento 1 y 2 (5.89 g/d y 5.57 g/d) y que difirieron estadísticamente frente al tratamiento control ( $p=0.0139$ ). Estos valores tienen relación con la retención diaria de nitrógeno, ya que estos mismos tratamientos (T1 y T2) son los que presentan los valores más altos ( $p<.0001$ ) (7.44 g/d y 7.05 g/d respectivamente) en comparación con T0.

Finalmente, los derivados de purina (alantoína, ácido úrico, xantina + hipoxantina) se incrementaron en los animales que recibieron dietas con 15 % y 30 % de *A. melanoxylon* + enzimas fibrolíticas (40.62 g/d y 38.29 g/d) frente al tratamiento control (30.83 g/d) ( $p<.0001$ ). El aporte de nitrógeno microbiano está en relación a la concentración de los derivados de purina, así pues, en T1 y T2 el aporte fue de 33.12 y 35.13 g/d respectivamente y superaron estadísticamente al tratamiento control ( $p<.0001$ ).



## SUMMARY

The first objective of the project was to evaluate the influence of forages of tropical trees on the production of gas and enteric methane, effective degradation and in vitro real digestibility. The production of methane, AGV and N-NH<sub>3</sub> was measured at 24 hours of incubation. The tree legumes evaluated were: *Clitoria arborea*, *Erytrina fusca*, *Bauhinia forficata*, *Erytrina poeppigiana*, *Cratylia argentea*, *Glirycidia sepium*, *Cassia tora*, and *Flemingia macrophylla*. Ruminal fluid of four adult ewes (PV: 81.8 ± 3.33 kg) fistulated with permanent cannulas in the rumen was used. Gas production was measured from 3 to 120 hours of incubation. The parameters of in vitro gas production were lower ( $P < 0.05$ ) in the *C. arborea* ( $A = 41.68$  mL gas / g MS,  $c = 0.044\%$  / h and  $Lag = 1.654$  h). The average gas production rate for *B. forficata* was 1.017 ml / g MS ( $p < 0.05$ ). *C. arborea* presented a greater ( $p = 0.0001$ ) effective degradation of the MS (40.461 g / kg) and a real DM digestibility (82.517 g / kg) compared to the other forages. With respect to VFA, the highest ( $P < 0.05$ ) proportion of acetic, propionic and butyric observed in *C. arborea*, *G. sepium* and *E. poeppigiana* (72.52, 23.09 and 7.44 mol / 100 mol respectively) and the lowest ( $P = 0.0001$ ) acetic / propionic ratio was observed in *G. sepium* (2.92 mol / 100 mol). The content of N-NH<sub>3</sub> (mg / L) showed no difference. The lowest methane production ( $p = 0.0001$ ) was observed in *C. arborea* (1.23 ml CH<sub>4</sub> / g MS). *C. arborea* and *Cassia tora* presented greater potential in the reduction of enteric methane and ruminal modulation.

The aim of second research was to evaluate the influence of forage species adapted to the tropical region of Ecuador on gas production, enteric methane, digestion and ruminal fermentation. The production of methane, volatile fatty acids (VFA) and NH<sub>3</sub>-N were measured at 24 hours of incubation. The tree forage evaluated were: *Clitoria arborea*, *Erytrina fusca*, *Bauhinia forficata*, *Erytrina poeppigiana*, *Cratylia argentea*, *Glirycidia sepium*, *Cassia tora*, y *Flemingia macrophylla*. Ruminal fluid of four adult sheep (Live weight 81.8 ± 3.33 kg) fistulated with permanent cannulas in the rumen was used. Gas production was measured from 3 to 120 hours of incubation. The *in vitro* gas production parameters were lower ( $P < 0.05$ ) in the *C. arborea* ( $A = 41.68$  mLgas/g DM,  $c = 0.044\%/h$  and  $Lag = 1.654$  h). The average gas production rate for *B. forficata* was 1.017 mL/h ( $p < 0.05$ ). *C. arborea* presented higher ( $P = 0.0001$ ) effective degradation and real DM digestibility (40.461 g/kg and 82.51 mg/g respectively). With respect to VFA, the highest ( $P < 0.05$ ) proportion of acetic, propionic and butyric was observed in *C. arborea*, *G. sepium* and *E. poeppigiana* (72.52, 23.09 and 7.44 mol/100 mol respectively) and the lowest ( $P = 0.0001$ ) ratio: acetic/propionic, was observed in *G. sepium* (2.92 mol/100mol). The content of N-NH<sub>3</sub> (mg/L) showed not difference. The lowest ( $P = 0.0001$ ) methane production was observed in *C. arborea* (1.23 mLCH<sub>4</sub>/g DM). The use of forage species of tropical climate rich in secondary metabolites in ruminant diets, has the capacity to reduce the gas production and enteric methane, however, this at the expense of the reduction of the fermentation of organic matter in the rumen.

In the third part of the investigation, the inclusion of A. melanoxydon included at 15% (T1) and 30% (T2) in sheep diets compared to a control treatment (T0) was evaluated. The variables to be measured were productive behavior, voluntary consumption, methane production and contribution of microbial protein. The productive behavior of the different treatments. T1 and T2 were

statistically higher ( $p = 0.0288$ ) at T0 for daily weight gain. Voluntary intake of dry matter and organic matter was higher in T1 and T2 ( $p = 0.0002$ ) when compared with T0. While the voluntary intake of FDN and FDA was higher ( $p < .0001$ ) for T2 (442.00 g / kg DM and 97.71 g / kg DM respectively) with respect to T1 and T0. The consumption of DM and digestible MO showed significant differences ( $p = 0.0017$  and  $p = 0.0025$  respectively) in T2 and T1 compared to T0. Finally, the consumption of digestible FND was 218.88 g / kg DM for T2 ( $p < .0001$ ), showing a concordance with its digestibility that had a value of 502.67 g / kg DM ( $p = 0.0002$ ), in both cases they were superior in relation to T0 and T1. The production of ruminal methane per day (table 5) was lower ( $p = 0.0004$ ) for T0 (2.20 mol / d), in contrast to T1 and T2. No significant differences were found in terms of energy losses as methane or changes in ruminal pH in the animals used. The concentration of the VFA in the ruminal fluid collected showed no changes in the different treatments, but there were significant differences ( $p = 0.0338$ ) in the acetic: propionic ratio, when comparing T1 (3.17) with the other treatments. As regards the nitrogen balance, a decrease in the N content in urine of the animals corresponding to treatment 1 and 2 (5.89 g / d and 5.57 g / d) was observed and they differed statistically compared to the control treatment ( $p = 0.0139$ ). These values are related to the daily nitrogen retention, since these same treatments (T1 and T2) have the highest values ( $p < .0001$ ) (7.44 g / d and 7.05 g / d respectively) compared to T0.

Finally, the purine derivatives (allantoin, uric acid, xanthine + hypoxanthine) were increased in the animals that received diets with 15% and 30% of *A. melanoxylon* + fibrolytic enzymes (40.62 g / d and 38.29 g / d) compared to the treatment control (30.83 g / d) ( $p < .0001$ ). The contribution of microbial nitrogen is related to the concentration of purine derivatives, thus, in T1 and T2 the contribution was 33.12 and 35.13 g / d respectively and statistically exceeded the control treatment ( $p < .0001$ ).





## 1. INTRODUCCIÓN

Los gases de efecto invernadero (GEI) son aquellos que absorben la radiación infrarroja, atrapando calor y calentando la superficie de la tierra, a este proceso se le conoce como efecto invernadero (Bonilla-Cárdenas et al., 2012). Para Sejian et al. (2010) los GEI como el metano ( $\text{CH}_4$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y los clorofluorocarbonos reciben la mayor atención como factor relacionado con el calentamiento global, ya que causan fuertes radiaciones significativas.

En este sentido Johnson & Johnson (1995) señalan que el metano colabora en los efectos climáticos directamente, a través de su interacción con la energía infrarroja e indirectamente a través de las reacciones de oxidación atmosféricas que producen  $\text{CO}_2$ . Por esto se considera que en la actualidad los sistemas de producción animal sostenibles deben propender por una menor producción de metano.

Consecuentemente existe la necesidad de contar con inventarios de producción de gases de efecto invernadero (GEI) de cada país y la cual debe determinarse basados de datos científicos (Leuning et al., 1999), especialmente en países en vías de desarrollo donde se encuentran sistemas extensivos y es esencial que las emisiones de GEI relacionados con el ganado sean monitoreadas y controladas a corto plazo.

El metano ( $\text{CH}_4$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y el óxido nitroso tienen la capacidad de elevar la temperatura de la tierra mediante la absorción de la radiación de onda larga, por lo que son identificados como gases de efecto invernadero (GEI). En este sentido el  $\text{CH}_4$  es el gas de efecto invernadero de mayor importancia para el calentamiento global después de las emisiones de  $\text{CO}_2$ . Un 70% de la producción de metano es de origen antropogénico, de los cuales la agricultura representa un 66% de ésta producción, siendo la fermentación entérica responsable de un tercio (22%) del metano procedente de la agricultura (Moss et al., 2000), y para el año 2013 el metano entérico representó el 39% de las emisiones de GEI generadas por la ganadería (Gerber et al., 2013).

La producción de metano proveniente de la fermentación entérica depende de la especie animal involucrada, es así que se atribuye un 730 g / kg/año de metano al ganado bovino (Johnson y Johnson, 1995), 9 kg/año/animal de emisión ruminal de  $\text{CH}_4$  en ovinos (Mbanzamihigo et al., 2001).

Por otra parte, el metano además de estar considerado como un GEI, también representa una pérdida de energía alimentaria, como lo reporta Singh et al., (2005) indicando que la pérdida de energía de la ganadería en rumiantes en la India es de  $739,30 \times 10^8$  moles de ATP por día. Por lo tanto, es deseable desarrollar estrategias de alimentación para reducir la emisión de  $\text{CH}_4$  entérico, para mitigar los efectos nocivos producidos en la atmósfera por estos gases.

Por lo tanto, las estrategias que se han usado para mitigar la producción de metano entérico se han desarrollado para alterar las diferentes causas relacionadas a la fermentación entérica, como por ejemplo la modificación de la población de animales rumiantes, procesos biotecnológicos para modificar los microorganismos metano génicos, y manipulación nutricional (Bonilla-Cárdenas et al., 2012).



Las alternativas más viables parece ser la manipulación nutricional buscando dietas energéticamente eficientes y con metabolitos secundarios que module la fermentación en el rumen, y reduzca la producción variable de gases (especialmente metano) emitido a través del eructo (Carmona et al., 2009).

Unas de las estrategias utilizadas para reducir la emisión de CH<sub>4</sub> es el uso de taninos condensados (TC) que están presentes en ciertas leguminosas arbustivas que pueden ser utilizadas en la alimentación de rumiantes (Carulla et al., 2005; Puchala et al., 2005).

En este sentido, Carulla et al. (2005) demostraron que la inclusión de 29 g/kg de MS de taninos condensados presentes en *Acacia mearnsi* redujo la emisión de CH<sub>4</sub> en 130 kJ / MJ en las ovejas alimentadas con una mezcla de *Lolium perenne* y *Trifolium pratense*. De forma similar Hess et al. (2003) reportan que la emisión *in vitro* de CH<sub>4</sub> disminuyó a la mitad cuando un tercio de la dieta herbácea fue reemplazada por la leguminosa tropical *Calliandra calothyrsus* con un contenido de taninos condensados de 270 g/ kg de MS.

El empleo de arbustivas que contienen altas cantidades de compuestos secundarios como taninos condensados, fenoles, terpenos, saponinas, han sido utilizados en experimentos *in vivo* e *in vitro* para rumiantes para alcanzar estos objetivos (Barros-Rodríguez et al., 2015; Giraldo, n.d.; Soliva et al., 2008; Soltan et al., 2016; Tedeschi et al., 2014.)

Investigaciones realizadas *in vitro* con *Leucaena leucocephala* (Soltan et al., 2016) demostraron que por su contenido de mimosina existe un efecto sobre la bioactividad de los taninos y la producción ruminal de CH<sub>4</sub> evidenciando como resultado una modulación ruminal reflejada en la disminución (P <0,01) la producción de gas.

De igual forma en experimentos *in vivo* (Animut et al., 2008) al comparar dietas basadas en forrajes ricos (*Lespedeza striata*) y bajos (*sorghum-sudangrass*) en taninos condensados se demostró que las dietas que incluían *Lespedeza striata* disminuyó la emisión de CH<sub>4</sub> de las cabras sin importar su nivel de alimentación, atribuyéndolo al contenido de taninos condensados, y que parecía afectar directamente la actividad de las bacterias metano génicas, aunque podrían haberse producido alteraciones de la actividad protozoaria. Estos hallazgos sugieren que se podrían emplear niveles relativamente bajos de TC para disminuir la emisión de CH<sub>4</sub> sin un marcado efecto perjudicial en otras condiciones tales como la proteína del tracto total.

Sin embargo, cada lugar geográfico posee distintas variedades de leguminosas arbustivas cada una de ellas con contenidos de metabolitos secundarios diferentes y dependientes de las condiciones ambientales propias de cada región (Lorenzo & Rodríguez-Echeverría, 2015). Y por otro lado, los efectos de diferentes niveles de un forrajes específico para una variedad y un lugar geográfico que contenga taninos condensados en la emisión de CH<sub>4</sub> no se han investigado en experimentos *in vivo* (Animut et al., 2008).

Por otro lado, en el Ecuador se han identificado varias especies arbóreas y arbustivas (MAE 2013). En el sur del país se han identificado arbustivas leguminosas (Valarezo & Ochoa, 2014) como *Thichanthera gigantea* (quiebra barriga), *Gliricidia sepium* (gliricidia), *Erythrina peruviana* (eritrina), *Leucaena leucocephala* (acacia forrajera), y *Moringa oleífera* (moringa) estableciéndolas como bancos de proteína. Adicionalmente, algunas de estas arbustivas poseen también altas cantidades de compuestos secundarios (Delgado et al., 2007; Gaona, 2015; Molina et al., 2013).

Otras especies arbustivas como *Acacia dealbata*, *Acacia Melanoxylon*, *Albizzia lophanta*, *Lupinus pubescens*, *Inga insignes*, *Mimosa quitensis*, *Acacia angustísima*, *Prosopis pallida*, entre otras, son arbustivas potencialmente con cualidades para reducir la producción de gases de origen ruminal, por lo que se requiere investigar sus efectos sobre la producción de metano entérico, fermentación ruminal y síntesis de proteína microbiana en rumiantes y buscar mitigar la emisión de gases de efecto invernadero.



## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

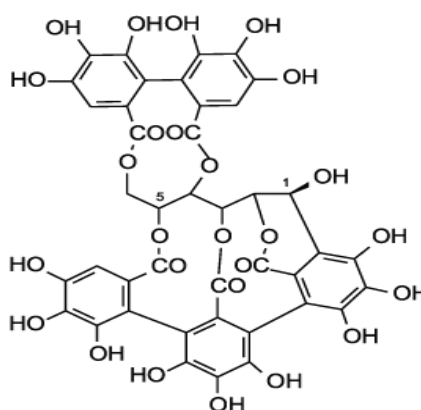
### 2.1. METABOLITOS SECUNDARIOS EN PLANTAS

Los metabolitos secundarios encontrados en las plantas, corresponden a un diverso grupo de moléculas que están relacionadas en procesos adaptativos de las plantas a su medio ambiente, pero no son parte de las vías bioquímicas primarias del crecimiento celular y de la reproducción. Existen más de 24 000 estructuras, incluidos muchos compuestos que tienen efectos anti nutricionales y tóxicos en los mamíferos. Este número no incluye los compuestos polifenólicos oligoméricos (proantocianidinas y taninos hidrolizables) que ahora se están describiendo con mayor precisión y aumentarán el número en varios miles. Algunos de los principales metabolitos o fitoquímicos secundarios de las plantas que se encuentran en las plantas incluyen inhibidores de la proteasa, lectinas, alcaloides, aminoácidos no proteicos, glucósidos cianogénicos, saponinas y taninos (Makkar, H., Siddhuraju, P., & Becker, K. 2007).

Las plantas tienden a producir diferentes tipos de taninos complejos, y no todos los taninos tienen los mismos efectos. La digestión de los alimentos ricos en taninos parece ser facilitado durante este mismo proceso, por una fuente de energía que interviene en la desintoxicación de cualquier compuesto fenólico asociado, o utilizando mezclas de alimento en lugar de especies individuales que contengan altas cantidades de taninos. Además, se ha reportado interacciones tanino-proteína y sus efectos sobre la digestión de proteínas y la salud animal. Sin embargo, se recomienda prudencia cuando se atribuyen a los taninos efectos fisiológicos sobre el organismo del animal, ya que el tracto digestivo es un sistema complejo que contiene microorganismos y presenta diferentes procesos fisiológicos que pueden interactuar con los taninos, y por lo tanto, modular sus efectos (Mueller-Harvey, 2006).

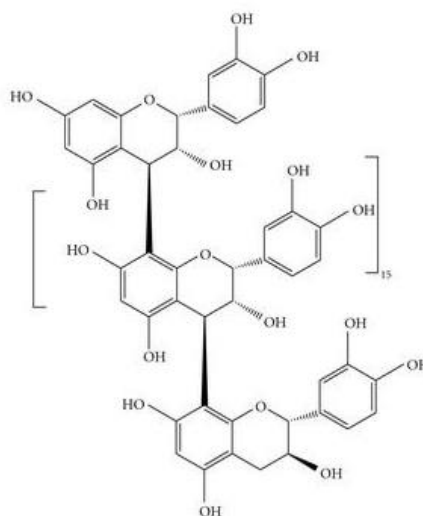
#### 2.1.1. Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos que se clasifican ampliamente en dos grupos principales: a). taninos hidrolizables, que consisten en un núcleo central de carbohidratos a los que se unen los ácidos carboxílicos fenólicos por enlace éster (Fig. 1).



**Fig. 1.** Estructura de tanino hidrolizable (Castalagina)

b). Taninos condensados, o proantocianidinas, que consisten en oligómeros de dos o más flavan-3-ols, como la catequina, la epicatequina o la galocatequina (Fig. 2).



**Fig. 2.** Estructura de tanino condensado (*Sorghum procyanidin*)

Los taninos tienen una afinidad muy alta por las proteínas y forman complejos de tanino-proteína. El consumo de una planta que contiene taninos condensados disminuye la utilización de nutrientes, la proteína se ve afectada en gran medida y disminuye el consumo de alimento.

Por otro lado, los taninos hidrolizables son potencialmente tóxicos para los animales. El consumo de alimentos que contienen altos niveles de taninos hidrolizables causa toxicidad hepática y renal y conduce a la muerte de los animales (Makkar, H., Siddhuraju, P., & Becker, K. 2007).

En este sentido, varios estudios (Gemedá & Hassen, 2015; Animut et al., 2008; Getachew et al., 2008) han demostrado que los taninos tienen actividad antimetanogénica debido a la reducción del metano entérico en animales que se alimentaron con plantas ricas en taninos. Estos resultados se relacionaron a una inhibición directa de metanógenos o indirectamente por inhibición de protozoos.

Sin embargo, los taninos al ser polímeros complejos con varios enlaces y enlaces que varían entre las especies de plantas y dentro de las partes de las plantas (Makkar, 2003), generan diferencias en su grado de polimerización y consecuentemente en sus propiedades biológicas (Patra & Saxena, 2010). Ligado a esto, el comportamiento de la función ruminal frente a los taninos, va a estar en función de la fuente, el tipo y la concentración del tanino en la planta (Mueller-Harvey, 2006).

Por ejemplo, *Onobrychis viciifolia* que contenía 3.5% de taninos (expresado como equivalentes de ácido tánico) comparada con *Medicago sativa* disminuyó la producción de gas a nivel ruminal e incrementó la concentración de ácidos grasos poliinsaturados relacionando su acción sobre la biohidrogenación en el rumen (Toral et al., 2016). Por su parte, Gemedá & Hassen, (2015) utilizando varias plantas arbustivas tropicales con concentraciones de taninos condensados entre 1,82% - 6,0 % (expresado como equivalentes de leucocianidina) reportó diferencias en la producción de gas, metano, digestibilidad y concentración de nitrógeno amoniacal. De igual forma

Rira et al., (2015) utilizando plantas ricas en taninos con concentraciones entre 1,8% - 8,9% de taninos condensados ( expresados como equivalentes de quebracho) también reportaron diferencias en la fermentación ruminal, concentración de ácidos grasos volátiles y degradación de la materia orgánica.

### Métodos Analíticos para la determinación de taninos.

Los métodos colorimétricos son los métodos más comunes para el análisis de taninos en material vegetativo. Es así que el método colorimétrico de la vainillina ha sido usado para la determinar la presencia de taninos condensados en cultivos de *Sorghum* y *Phaseolus vulgaris* (Barampama y Simard 1993), y semillas de vicia faba (Ortiz et al., 1993). Sin embargo, a pesar que éste método es sensible a niveles bajos de taninos condensados ha sido cuestionado por no identificar los taninos ligados a la fibra (Terril et al., 1992).

En consecuencia, se utilizó para el análisis de taninos condensados la reacción con HCl/butanol, método más simple y más específico comparado con el de Vainillina (Makkar H., et al 2007), éste método produce antocianidinas de color rosado sobre el clivaje oxidativo de los enlaces inter flavan de los taninos condensados en la presencia de ácidos minerales en solución alcohólica a 95°C. Este método fue modificado con la adición de hierro en el agente HCl/ butanol, mejorando la sensibilidad y repetitividad del ensayo. Una desventaja con el procedimiento HCl/ butanol es que a concentraciones muy bajas de taninos condensados (< 1% de su materia seca) es difícil detectar de manera efectiva el blanco para el color de fondo (Terril et al., 1992).

El posterior uso del Poli vinil pirrolidona (PVPP), como un fenol adsorbente en la solución HCl/butanol permitió el análisis de diferentes materiales alimenticios y reducir la interferencia causada por azúcares durante la reacción, logrando así determinar taninos condensados en la fracción soluble e insoluble de la fibra dietaria (Trugo and Von Boer 1998).

Por otro lado, el grado de polimerización de los taninos resulta en problemas de tipo analítico al realizar el análisis con HPLC (High Performance liquid chromatography), cuando se determina fracciones de taninos condensados. En este sentido la cromatografía de cadenas largas de polímeros puede verse afectadas ya que forman complejos insolubles en el sistema de cromatografía, dependiendo además del peso molecular de éstos compuestos. (Trugo and Von Boer 1998).

En este sentido, la cromatografía de fase inversa con columna de 18C se desarrolló identificación y separación de procianidina, sin embargo, la aplicación de HPLC de fase inversa con 18C parece estar restringida al análisis de procianidina de masa molecular relativamente baja lo que hace que esta técnica de poco uso para la determinación cuantitativa de taninos condensados en alimentos. (Trugo and Von Boer 1998).

### 2.1.2. Saponinas

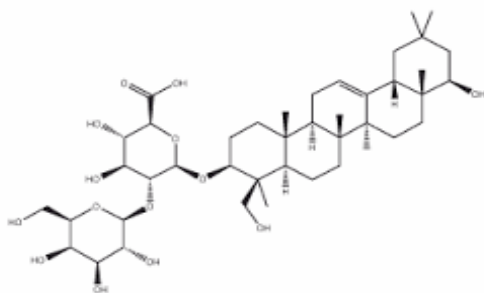
Las saponinas comprenden una gran familia de compuestos estructurales que contienen una aglicona esteroide o triterpenoide (sapogenina) unida a uno o más restos de oligosacáridos por enlace glicosídico (figura. 3). El resto de carbohidratos consiste en pentosas, hexosas o ácidos urónicos. La presencia de los grupos polares (azúcar) y no polares (esteroides o triterpenos) proporciona saponinas con fuertes propiedades de superficie activa que son responsables de muchos de sus efectos adversos y beneficiosos. El principal efecto biológico de las saponinas es la interacción con los componentes celulares y de la membrana. Por ejemplo, las saponinas hemolizan los glóbulos rojos por interacciones no específicas con proteínas de membrana, fosfolípidos y colesterol de eritrocitos.

Las saponinas se caracterizan por su actividad hemolítica y sus propiedades espumantes, y son responsables de impartir un sabor amargo y astringencia a materiales vegetales que contienen altas concentraciones de saponinas. No obstante, se informa que las saponinas afectan la permeabilidad de las células de la mucosa del intestino delgado y, por lo tanto, tienen un efecto sobre el transporte activo de nutrientes. También se ha demostrado que las saponinas inhiben varias enzimas digestivas, incluidas la tripsina y la quimotripsina, y también se sabe que inhiben la degradación de la proteína mediante la formación de complejos de saponina-proteína. Por otro lado, también se han informado efectos nutricionales positivos de saponinas específicas, como los efectos hipocolesterolémicos y la mejora del crecimiento en varias especies de animales. *Medicago sativa* (Alfalfa, lucerne) contiene muchas saponinas. El ácido medicagénico es exclusivo de la alfalfa. Las saponinas de alfalfa pueden disminuir la tasa de crecimiento en pollos y la producción de huevos de gallinas cuando se incluyen en dietas de aves de corral por encima del 5%.

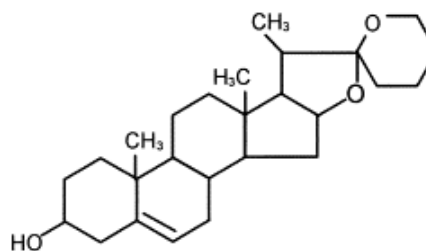
Los glucósidos cardíacos también son saponinas. Digitalin es el glucósido cardíaco que se encuentra en las especies de *Digitalis* y otras *Serophulariaceae*. El glucósido cardíaco estrofantina se encuentra en las apocináceas. Se ha reportado la intoxicación del ganado causada por la estrofantina cuando las ovejas y el ganado consumieron las hojas de *Acokanthera longiflora* y *Acokanthera schimperi*. La muerte es causada por la insuficiencia cardíaca.

Las saponinas están presentes en especies vegetales como: *Glycine máx.*, *Medicago sativa*, *M. lupulina*, *M. media*, *Chenopodium quinoa*, *Gycyrrhiza glabra*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna angularis*, *Asparagus officinalis*, *Amaranthus caudatus*, *Thea sinensis*, *Quillaja saponaria*, *Yucca mohavensis*, *Y. schidigera*, *Aloe barbadensis*, *Lathyrus hirsutus*, entre otras (Makkar et al., 2007).

## a. Saponina triterpena



## b. Saponina esteroidea

**Fig. 3.** Estructura de saponinas triterpena y esteroidea**2.2. FUNCIÓN RUMINAL**

La existencia del rumen permite realizar grandes transformaciones en los alimentos ingeridos generalmente de bajo valor nutritivo, con la posterior utilización por el rumiante de los productos de este trabajo bioquímico, los cuales son de mayor utilidad. Esto ha posibilitado la elaboración de dietas que son ampliamente aprovechados por estos animales. En el rumen se dan varios factores que permiten todo el trabajo bioquímico como son la existencia de una amplia gama de microorganismos; el pH ruminal; la temperatura del rumen y el estado de anaerobiosis.

Los microorganismos son de tipo protozoos, hongos, levaduras y bacterias, los cuales conforman la microflora del rumen. Entre los protozoos del rumen se encuentran rizópodos, flagelados y ciliados siendo estos últimos los principales. La fauna protozoaria del rumen alcanza, en condiciones normales, alrededor de  $10^6$  infusorios por mililitro de líquido ruminal. Los ciliados tienen actividad bacteriófaga y pueden sintetizar glucógeno, otros poliglúcidos, proteínas y algunos lípidos; además producen la fermentación de los glúcidos y otras acciones bioquímicas.

Los hongos del rumen del tipo anaeróbico fermentan la celulosa, y las levaduras pueden sintetizar proteínas, glúcidos y sobre todo vitaminas del complejo B (Dewhurst et al., 2000).

Todo este trabajo es importante, sin embargo, la mayor significación entre los microorganismos del rumen lo tienen las bacterias pues alcanzan la cifra de  $10^{10}$  gérmenes por mililitro, la mayoría anaerobias no esporuladas. El desarrollo bacteriano del rumen está condicionado por los demás factores presentes, tales como temperatura, pH y grado de anaerobiosis. Las bacterias del rumen son capaces de atacar la celulosa, el almidón y otros poliglúcidos, además de fermentar los monoglúcidos. La flora celulolítica del rumen está representada por decenas de especies diferentes, entre ellas las yodofilas que pueden segregar celulasa (beta glucosidasa) enzima que hidroliza la celulosa. Esto es, sin duda, uno de los aspectos más significativos del trabajo ruminal pues permite la digestión de la celulosa y su posterior aprovechamiento por el rumiante. Asimismo,



recientemente ha sido señalada a acción de los hongos anaerobios en la degradación de las fibras vegetales en íntima relación con las bacterias celulolíticas.

El pH ruminal, en condiciones normales, oscila de 6 a 6,5 aunque algunos autores establecen cifras más amplias de 5,4 a 7,4 y otros ofrecen cifras de 5,5 a 7; valores por debajo de 5,5 son característicos de la fermentación láctica. Es de destacar que el mantenimiento del pH dentro de estos límites permite el normal desarrollo de las bacterias fisiológicas del rumen. La fermentación de los glúcidos en el rumen produce grandes cantidades de ácido acético, propiónico y butírico, etc., lo que podría provocar un estado de acidosis. Sin embargo, la existencia de fuertes sistemas tampón en el líquido ruminal coadyuva a mantener el pH dentro de los límites normales. Los sistemas tampón más significativos del rumen están representados por los siguientes elementos:

1. Sistema ácido carbónico-bicarbonato
2. Sistema fosfato diácido-fosfato monoácido
3. Proteínas
4.  $\text{NH}_3$  (amoníaco) de la desaminación de los aminoácidos.

Todos estos factores determinan que los valores del pH del rumen se mantengan normales, con las oscilaciones fisiológicas antes señaladas. El amoníaco, por otra parte, actúa aceptando cantidades apreciables de  $\text{H}^+$ . Otros compuestos como el acético, propiónico, butírico y láctico, debido al pK que poseen no pueden actuar como buffer a los pH del rumen y actúan como donadores de  $\text{H}^+$ .

La temperatura ruminal es otro factor a considerar. Normalmente el rumen presenta una temperatura de 39,5 a 40°C. Puede ser de 1 a 1,5 superior a la temperatura rectal. Esta temperatura es mantenida por las condiciones normales del organismo y, además, por el trabajo bioquímico del rumen que libera cantidades apreciables de calor debido a la descarboxilación.

El aspecto relacionado con el estado de anaerobiosis existe en el rumen. El contenido de  $\text{O}_2$  del rumen es muy bajo y solo con la ingestión grosera de los alimentos llega algún oxígeno al rumen. El estado de anaerobiosis permite el desarrollo de una flora normal, ya que la mayoría de las bacterias ruminales son anaerobias no esporuladas. A su vez la existencia de las bacterias anaerobias permite que el metabolismo ruminal predominante sea de tipo anaeróbico con la consecuente producción de productos intermediarios que pueden ser usados posteriormente por el rumiante (Hobson & Stewart 1997).

#### 2.2.1. Fermentación ruminal

La fermentación en el rumen es el resultado de actividades físicas y microbiológicas que convierten los componentes de la dieta en productos que son útiles (ácidos grasos volátiles, proteína microbiana, vitaminas. Poco importantes como metano y dióxido de carbono o incluso dañinos (amoníaco, nitrato) para el huésped o animal.

Los animales rumiantes cultivan la población microbiana en el rumen suministrando y masticando el alimento regularmente agregando los tampones y eliminando los ácidos producidos, eliminando los productos microbianos y los residuos de alimentos no digeribles, y manteniendo las condiciones (pH, temperatura y humedad) apropiadas para el crecimiento microbiano (Church C.D. 1988).

### 2.2.2. Producción de metano en el rumen

El metano ( $\text{CH}_4$ ) forma parte de los productos finales de la fermentación junto a otros gases, y su producción es necesaria para la anaerobiosis microbiana. La emisión de metano entérico en rumiantes, se produce por la fermentación de los alimentos en el rumen y en el tracto digestivo inferior (arqueas metanogénicas) (Patra, 2012).

Las implicaciones para la formación de metano en el rumen se encuentran relacionadas con reacciones oxido-reductoras y que son inherentes a la fermentación ruminal. Estas reacciones redox ocurren a expensas de las coenzimas en un proceso complementario. Algunas de estas enzimas son NAD (Nicotinamida Adenin Dinucleótido) y FAD (Flavina Adenin Dinucleótido), sin embargo, existen otras enzimas transportadoras de electrones que participan activamente con las bacterias del rumen, ejemplo, ferredoxina (Church, 1988). Del catabolismo de sustratos ruminales surgen cantidades sustanciales de moléculas con poder reductor ( $\text{H}$ ), por lo que las bacterias desarrollan vías metabólicas que logren una reoxidación de los portadores de electrones. En contraste con las condiciones aeróbicas, las bacterias en medios anaeróbicos no poseen la capacidad de lograr la oxidación completa de los sustratos y por ende la eliminación final de la energía reductora de  $\text{O}_2$ , lo que da como resultado el desarrollo de otros procesos metabólicos (Russell, JB. 2002).

Uno de estos procesos metabólicos ocurre cuando las bacterias realizan rutas de fermentación relativamente simples, donde las moléculas con poder reductor generadas inicialmente, se eliminan en los productos finales de la fermentación. Estos procesos se realizan en el rumen, cuando se produce succinato o lactato. Sin embargo, otro proceso importante que sucede en el rumen son aquellas involucradas en la producción de acetato.

Dichas bacterias poseen hidrogenasas unidas a su membrana que son capaces de oxidar directamente los portadores de electrones reducidos, como NADH o ferredoxina, para producir  $\text{H}_2$ . Como consecuencia de este proceso se originan en el rumen grandes cantidades de  $\text{H}_2$ , además, otros microorganismos del rumen, como protozoos y hongos, también producen  $\text{H}_2$  en cantidades considerables (Russell y Wallace, 1997).

Por otra parte, estas hidrogenasas unidas a la membrana bacteriana y ligadas a NADH son altamente sensibles a  $\text{H}_2$ , y se inhiben rápidamente cuando la presión de  $\text{H}_2$  se acumula (Russell, JB. 2002). Por lo que para garantizar una fermentación adecuada en el rumen es necesario que exista una baja concentración de  $\text{H}_2$  y que sea eliminado de una manera rápida y eficiente.

En el rumen, esta función es cumplida por las archaeas metanogénicas. Las arqueas metanogénicas (metanógenos) carecen del peptidoglicano que se encuentra en las paredes celulares de las bacterias, pero contienen pseudomureína, heteropolisacárido o proteína en sus paredes celulares (Hobson & Stewart, 1997). Éstos metanógenos utilizan efectivamente el  $H_2$  para reducir el  $CO_2$ , produciendo como producto final metano ( $CH_4$ ) que es eliminado por el animal a través del eructo. El hidrógeno ( $H_2$ ) producido en el rumen es una fuente de energía importante para el crecimiento de metanógenos y está presente en dos formas:  $H_2$  disuelto ( $dH_2$ ) y  $H_2$  gas ( $gH_2$ ). Los metanógenos solo utilizan  $dH_2$  (Wang et al, 2014).

La sobresaturación de  $dH_2$  puede ser causada por una limitación de masa transferencia a través de la interfaz líquido-gas, lo que indicaría que la ley de Henry podría no ser aplicable para describir las distribuciones de  $H_2$  entre las fases de gas y líquido en el rumen. Los concentrados producen mayores cantidades de  $H_2$  y  $CH_4$  que los forrajes, debido a una fermentación más extensa (Wang et al, 2014).

Bryant, (1979) clasificó a las bacterias ruminales según la forma de utilización y producción de  $H_2$ , en: bacterias productoras de propionato, productoras de butirato, productoras de etanol y/o lactato, productoras de acetato e  $H_2$  y, por otra parte, archaeas metanogénicas que utilizan  $H_2$  como sustrato. Las principales archaeas metanogénicas descritas son *Methanobrevibacter spp.*, *Methanomicrobium spp.*, *Methanobacterium spp.* and *Methanosarcina spp* (Hobson and Stewart, 1997).

Las bacterias que producen propionato, teóricamente podrían someterse a una fermentación completa sin necesidad de eliminar  $H_2$ , es decir no dependen de la formación de metano. Por su parte, las bacterias productoras de butirato muestran una clara dependencia de aquellas productoras de acetato para una fermentación eficiente.

Por lo tanto, la formación de  $CH_4$  y, en menor medida, la producción propiónica son las vías principales para que los microorganismos del rumen eliminen el poder reductor (NADH) (Bodas et al., 2012).

Por otra parte, las archaeas metanogénicas producen también  $CH_4$  de manera autótrofa y parece ocurrir principalmente a partir de  $CO_2$  y  $H_2$  (Patra, 2012). El origen del  $H_2$  ya se ha descrito, pero el  $CO_2$  es abundante en el rumen como consecuencia de la descarboxilación de los metabolitos durante la fermentación y debido al amortiguamiento del bicarbonato (Bodas et al., 2012).

### 2.2.3. Degradación ruminal de los carbohidratos

La pared celular de la planta es una estructura compleja compuesta de lignina, celulosa y hemicelulosa, pectina, algunas proteínas, sustancias nitrogenadas lignificadas, ceras, cutinas y componentes minerales. Este material se divide en sub áreas de matriz insoluble, que incluyen

lignina, celulosa y hemicelulosa, que están covalentemente reticuladas, y la pectina, ceras y proteínas más solubles y extraíbles (Van Soest, 1994).

Una mayor estabilidad molecular implica un mayor costo de energía (activación) para la síntesis o degradación, y es un factor negativo en relación con la disponibilidad de nutrientes. La relevancia de este concepto se puede ver en las propiedades contrastantes del almidón ( $\alpha$  1-4 glucano) y celulosa ( $\beta$  1-4 glucano), que esencialmente son isómeros. El almidón se produce en muchos sistemas vivos como un hidrato de carbono de reserva, mientras que la celulosa se presenta solo como un elemento estructural que las plantas no pueden recuperar como fuente de energía. La refractariedad de la celulosa no es totalmente explicable por el enlace  $\beta$  1-4 que, en sí mismo es algo más estable que un  $\alpha$  1-4, pero depende en gran medida de la asociación y conformación intermolecular de la macromolécula (Van Soest, 1994).

Al ingresar con la dieta el almidón es atacado principalmente por las bacterias amilolíticas que lo desdoblan para consumir glucosa y producir AGV, especialmente propionato. La digestibilidad del almidón en el rumen es elevada y la fracción que logra pasar al intestino puede ser degradado por la amilasa pancreática y así absorberse como glucosa. Esta última alternativa favorece al rumiante al aportarle una fuente directa de glucosa, que de otro modo debería sintetizar por gluconeogénesis hepática empleando el propionato absorbido en el rumen. Un mecanismo que transfiere pequeñas cantidades de almidón al intestino son los protozoos, que pueden almacenarlo en su cuerpo (Relling & Mattioli, 2008).

Hay que tener en cuenta que la degradación del almidón y materia seca ha mostrado ser diferente en varias especies vegetales, que en los últimos años han sido mejoradas genéticamente. En este sentido, la tasa de degradación *in situ* y la degradabilidad efectiva del almidón difirieron significativamente entre el centeno, triticale y cebada (Krieg et al, 2017).

La digestibilidad ruminal del almidón depende en gran medida de la facilidad con que acceden a él las bacterias amilolíticas. Los granos almacenan el almidón en forma de gránulos en una zona llamada endosperma, protegidos por el pericarpio, que es una resistente envoltura externa del grano que es prácticamente indigestible para los microorganismos ruminales. Por otro lado, cada gránulo de almidón se encuentra recubierto por una capa proteica, la cual es gruesa y aísla por completo al gránulo de almidón en el llamado endosperma córneo, o bien es laxa e incompleta en el denominado endosperma harinoso. Consecuentemente, cuando se intenta aumentar la disponibilidad ruminal del almidón se emplean dietas con grano quebrado o molido o bien se eligen granos con mayor porcentaje de endosperma harinoso (Relling & Mattioli, 2008).

Los carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectina) reciben este nombre porque sirven de estructura y sostén del vegetal. Los vegetales, carentes de esqueleto, mantienen en parte su forma gracias a la presencia de una pared celular rígida, que rodea a las células vegetales. Cuando el forraje es tierno, las paredes celulares poseen la mayor concentración de pectinas, y a medida que maduran pasan a predominar la celulosa y la hemicelulosa que le otorgan mayor resistencia, para que finalmente aparezcan concentraciones crecientes de lignina, que infiltra la

pared celular y le da mayor rigidez y el color amarillento característico del forraje maduro. Entre los componentes de la pared celular se encuentran también cadenas de glucoproteínas. Estructuralmente la celulosa es un polímero de glucosas unidas por enlaces glucosídicos beta 1-4, y su estructura fibrilar le permite unirse entre sí por puentes de hidrógeno, creando fibrillas de gran resistencia. La hemicelulosa y la pectina se caracterizan por ser más heterogéneas, incluyendo monosacáridos neutros y ácidos como el ácido galacturónico, especialmente abundante en la pectina.

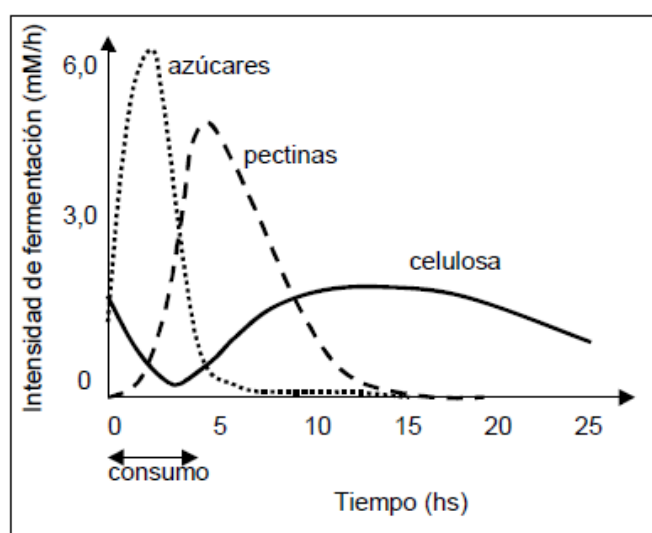
Las uniones glucosídicas de tipo beta no son atacadas por enzimas digestivas, sólo pueden ser degradadas por las enzimas microbianas liberadas por la flora ruminal, lo cual representa la base de la simbiosis bacteria-rumiante en los procesos digestivos fermentativos. La degradación de los carbohidratos estructurales sigue los siguientes pasos:

- a) Los microorganismos celulolíticos se adhieren a la superficie de los trozos de fibra vegetal, cortada por efecto de la masticación, mezclado y rumia con el fin de exponer la pared celular. Si bien el ataque bacteriano puede realizarse sobre la superficie de la hoja, esta está recubierta por ceras que perjudican la adhesión celular y en este caso las bacterias inician su acción sobre las estomas foliares libres de ceras, de cualquier modo, la degradación sería muy lenta si no mediase la ruptura del forraje.
- b) Los microorganismos liberan en el medio ruminal celulasas que realizan la digestión extracelular de la celulosa produciendo residuos pequeños, especialmente celobiosa (disacárido). El efecto de las celulasas sobre la superficie de la fibra vegetal se observa como canales.
- c) La celobiosa es incorporada a la bacteria y atacada por la celobiasa, que la desdoblará en dos glucosas.
- d) La glucosa es utilizada por el microorganismo para obtener energía vía glucolítica y producir AGV como producto final, principalmente acetato, que es eliminado del soma bacteriano (Relling & Mattioli, 2008).

La celulosa representa del 10 al 30 % de la materia seca del forraje y su digestibilidad varía entre el 50 y el 75 %. La hemicelulosa se encuentra en una concentración algo menor (10-25 % de la materia seca) y su digestibilidad varía entre el 35 y el 80 %. Las variaciones en la digestibilidad de ambas están provocadas fundamentalmente por la concentración de lignina en el forraje. Estructuralmente la lignina no es un carbohidrato, sino un polímero de unidades fenil propano de estructura muy compleja y de elevado peso molecular. Representa menos del 3 % de la materia seca en forrajes tiernos y aumenta con el ciclo vegetativo hasta concentraciones superiores al 15 %. Como no es digestible ni por las enzimas digestivas del animal ni por las microbianas del rumen, carece de valor nutricional y además bloquea el acceso de los microorganismos a los carbohidratos de la pared (Van Soest, 1994).

La digestión ruminal de las pectinas es muy diferente de los otros carbohidratos estructurales. Si bien forman parte de la pared celular son cuantitativamente importantes en los forrajes tiernos, en los cuales la pared celular poco desarrollada facilita su disponibilidad a nivel ruminal. Además, las pectinas son ricas en ácido galacturónico, que al poseer carga + les otorgan una solubilidad que las hace casi completamente digestibles. Por esta razón las pruebas más comunes de valoración de los alimentos incluyen las pectinas en el mismo grupo que los azúcares, como carbohidratos solubles. Los carbohidratos simples o azúcares se encuentran generalmente en concentraciones menores al 10 %, salvo en los pastos tiernos de primavera, durante el rebrote del forraje, cuando alcanzan hasta el 20 % de la materia seca. Se encuentran dentro de las células vegetales y se solubilizan rápidamente en el líquido ruminal, por lo cual su degradación en el rumen es completa (Relling & Mattioli, 2008).

La intensidad con la que los carbohidratos se digieren en el rumen (incluyendo la velocidad y el porcentaje de digestibilidad) depende fundamentalmente de la facilidad con la que los microorganismos puedan tomar contacto y captarlo, por lo cual depende especialmente de su solubilidad en el medio líquido ruminal (Figura 4).



**Fig. 4.** Esquema de fermentación de los carbohidratos en los forrajes

Del mismo modo que los azúcares simples poseen alta disponibilidad ruminal, lo propio ocurre con el resto de los componentes del contenido celular (fosfolípidos y proteínas solubles). Por esta razón, cuando un rumiante consume forrajes tiernos, como en un rebrote de primavera, por ejemplo, la relación contenido: pared celular es suficientemente alta como para crear condiciones de fermentación muy diferentes a cuando el animal consume forrajes maduros con alto contenido de pared celular. En este último caso el predominio de “fibra”, o carbohidratos no solubles (celulosa y hemicelulosa) condiciona el desarrollo de un ambiente típicamente celulolítico, con pH superior a 6 y baja producción y absorción de AGV, entre los que predomina el acetato. Cuando lo que predomina es contenido celular de alta disponibilidad, aunque el animal se alimente de forraje, el aporte de “fibra” es bajo y las condiciones ruminales resultantes serán más semejantes a dietas

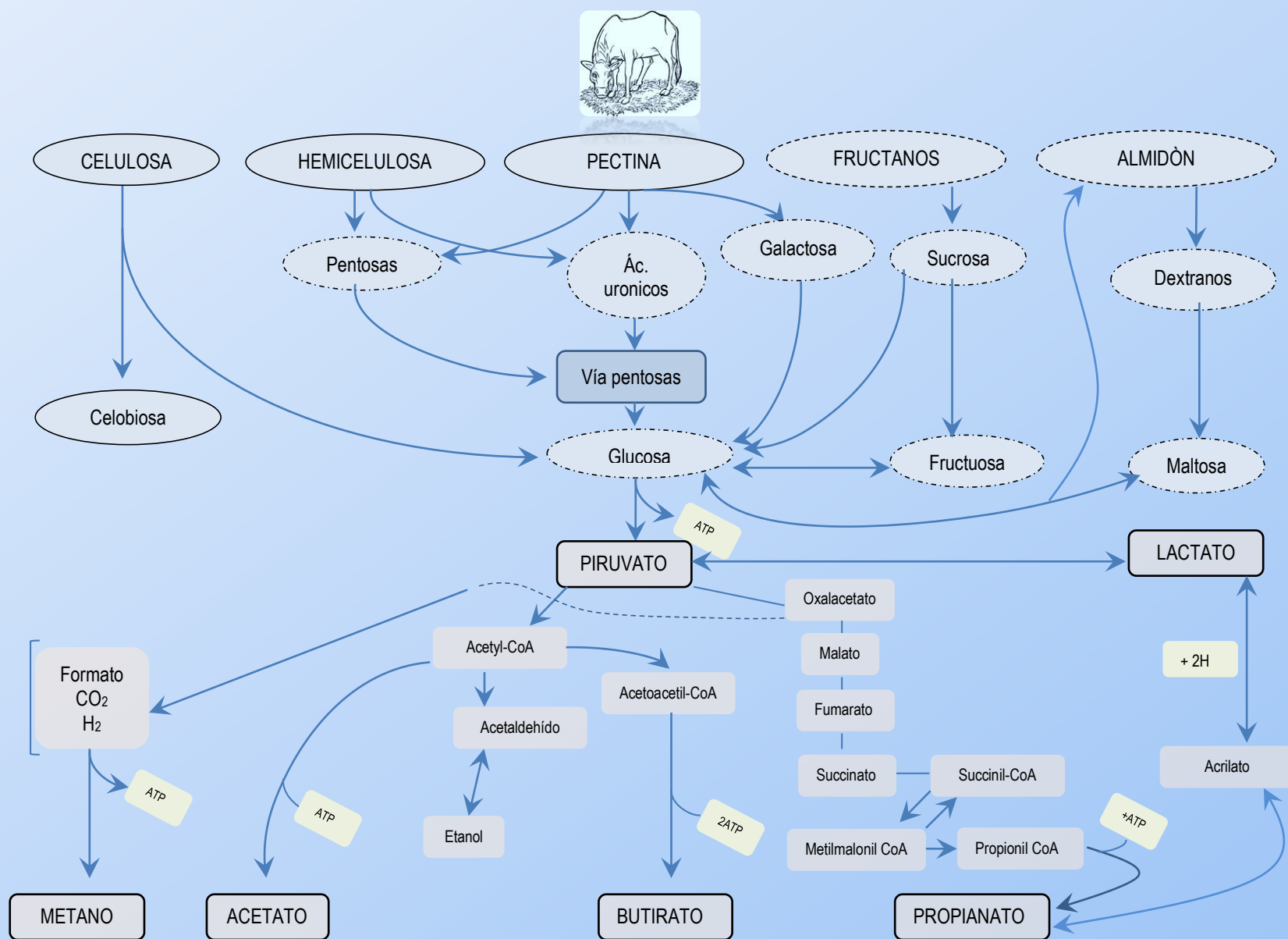
suplementadas con almidón, con menor pH y mayor producción de AGV, la mayor concentración en particular será de propionato (Relling & Mattioli, 2008).

#### 2.2.4. Metabolismo ruminal de los carbohidratos

##### Rutas metabólicas

Las principales rutas del metabolismo bacteriano del rumen se muestran en la figura 5. Las cepas individuales pueden metabolizar el carbono a través de ciertas vías, de productos intermedios que se recogen y de otras cepas. Las bacterias del rumen no desarrollan un ciclo completo de ácido cítrico porque no pueden oxidar el acetato a  $\text{CO}_2$  y agua. De hecho, partes del ciclo (por ejemplo, de malato a succinato) tienden a operar en sentido inverso en comparación con la vía que desarrollan los organismos aeróbicos. La formación de oxaloacetato es un paso importante y se puede lograr mediante la fijación de fosfoenolpiruvato de  $\text{CO}_2$  y en menor grado (según la disponibilidad de metilmalonato) mediante transcarboxilación. La energía conservada por el atrapamiento en ATP se puede utilizar para el crecimiento celular por encima de los requerimientos de mantenimiento. Dos moléculas de ATP se derivan de la formación de lactato, que contiene aún más energía fermentable. Toda la conversión a acetato involucra la utilización de 4 moléculas de ATPs, asumiendo que el transporte de hidrógeno no es limitante.

Las vías que se muestran en la figura 5, no indican todos los casos de conservación de energía. Por ejemplo, en la hidrólisis de celulosa por *Ruminococcus*, la energía en el enlace glicosilo se conserva en la formación de glucosa-1-fosfato. La exportación de un ácido iónico libre puede ser promovida por membranas lipófilas, y por lo tanto puede proporcionar la exportación libre de protones (Van Soest, 1994).



**Fig. 5.** Vías del metabolismo de los carbohidratos en el rumen



El metabolismo del oxaloacetato a succinato es la ruta principal utilizada por los organismos del rumen para sintetizar propionato. La síntesis directa de propionato a partir del piruvato a través de las vías de acrilato se ve favorecida en el rumen de los animales alimentados con dietas altas en concentrados. *Megasphaera elsdinii* es probablemente responsable de la síntesis de propionato a través del acrilato. En estas condiciones, la producción neta de propionato aumenta considerablemente en comparación con los animales alimentados con forraje.

El etanol, si se forma a expensas del acetato, ambos se derivarán de acetyl-CoA. La formación de acetato a partir de piruvato produce al menos 1 mol de ATP, mientras que la formación de etanol a partir de piruvato no produce ninguno. Esta competencia favorece la producción de acetato sobre la del etanol. El ácido butírico se produce mediante la condensación de dos moléculas de acetyl-CoA y n-valerato a partir de propionil-CoA y acetyl-CoA. El isobutirato, el isovalerato y el 2-metilbutirato surgen de la degradación de la valina, la leucina y la isoleucina.

La producción de estos ácidos es extremadamente importante. Son factores de crecimiento para muchos organismos celulolíticos, y otras especies utilizan la síntesis de ácidos grasos de cadena larga y, a veces, para la síntesis de aminoácidos.

El CO<sub>2</sub>, el amoníaco y las cadenas carbonadas específicas, son requeridas en la formación de aminoácidos. Debido a sus cadenas laterales saturadas, los isoácidos y sus aminoácidos relativos se encuentran entre las sustancias más hidrófobas al compararlos entre los AGV y los aminoácidos, respectivamente.

Los péptidos hidrófobos que contienen estos aminoácidos se metabolizan más lentamente. Las tasas reducidas de metabolismo, junto con el hecho de que el catabolismo de aminoácidos por desaminación oxidativa es el resultado de ambientes anaeróbicos, hace que estos aminoácidos y sus productos se reduzcan a una fermentación celulolítica. El problema es más grave en la fermentación rápida y cuando los ionóforos están presentes en el alimento. Los ionóforos bloquean el transporte de iones de hidrógeno, aumentando la relación intracelular NADH-NAD y hacen que el reciclaje de NAD a NADH sea más difícil. Esta limitación en la desaminación oxidativa es una razón por la cual se inhibe la proteólisis y la tasa de pasaje ruminal de las proteínas sean promovidas por los ionóforos.

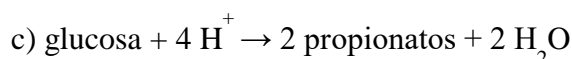
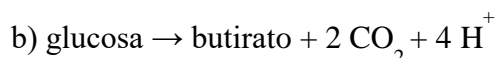
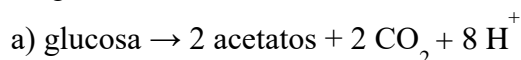
Los microorganismos anaeróbicos del rumen anaeróbico no pueden obtener energía a partir de los ácidos grasos de cadena larga, pero pueden sintetizarlos para las necesidades metabólicas u obtenerlos de fuentes dietéticas.

Los ácidos grasos de cadena larga pueden ser sintetizados a través de la condensación de unidades de acetato con cualquier ácido lineal o ramificado (Van Soest, 1994).

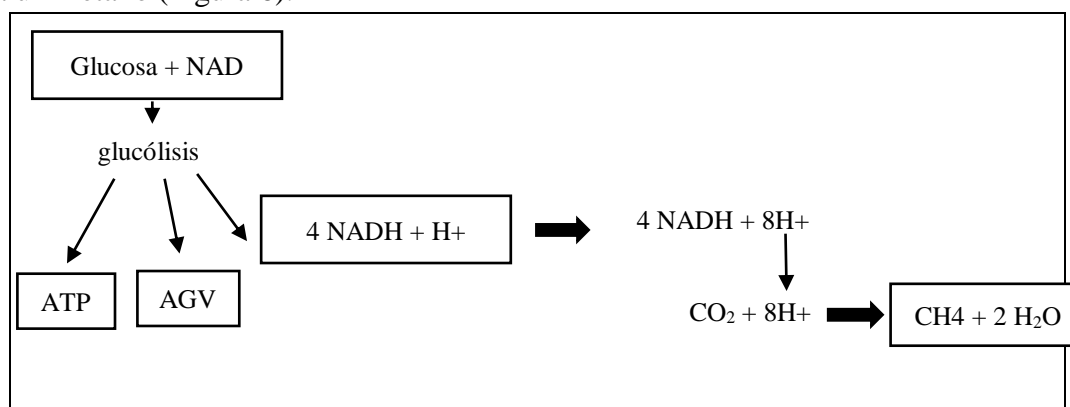
### 2.2.5. Balance de la fermentación ruminal

Varias teorías han sido documentadas para estudiar el balance de la fermentación ruminal basadas en el equilibrio entre el nivel de oxidación de los productos de la fermentación y los niveles de oxidación del sustrato (Wolin, 1960). También se ha relacionado a la producción de metano proporcionalmente con la cantidad de carbohidratos digestibles de la dieta consumida por el animal y la concentración de ácidos grasos volátiles presentes en el líquido ruminal.

Al ser el ambiente ruminal fuertemente anaeróbico los microorganismos sólo disponen de la vía glucolítica para obtener energía, produciendo AGV, ATP y  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Los microorganismos utilizan el ATP como fuente de energía y eliminan el AGV como un producto de desecho. Para poder degradar una segunda molécula de glucosa por la vía glucolítica necesitan que el cofactor que se ha reducido ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ ) sea nuevamente oxidado (NAD). Como el metabolismo microbiano es anaerobio y por lo tanto no existe una cadena respiratoria que acepte estos hidrogeniones, los microorganismos los transfieren a distintos aceptores de hidrógeno. Uno de los más importantes es el carbono, originando la formación de metano ( $\text{CH}_4$ ). A pesar de que este compuesto posee energía intrínseca no puede ser aprovechado por el rumiante, que no posee una ruta metabólica para degradarlo, y se pierde por eructación. Es así como la producción de metano en el rumen reduce la eficiencia en la utilización de la energía. Esta pérdida representa entre el 2 – 12 % de la energía aportada por la dieta (Piñeiro-Vázquez et al., 2015). Dependiendo del AGV producido, cada vía metabólica produce un balance diferente de hidrogeniones, según las siguientes ecuaciones:



Por cada 8  $\text{H}^+$  producidos (tomados de 4  $\text{NADH} + \text{H}^+$  o  $\text{FADH}_2$  que deben oxidarse) se forma un metano (Figura 6).



**Fig. 6.** Síntesis de metano para regenerar cofactor oxidado (NAD)

Si se observan las reacciones anteriores, se verá que la formación de metano será mayor con la producción de acetato, menor con la producción de butirato y en cambio se consumen hidrogeniones durante la síntesis de propionato. Esto demuestra que una dieta suplementada con almidón es más eficiente desde el punto de vista energético (Eusebio et al., 1959). Por otro lado, la suplementación con almidón aumenta la energía aportada por la dieta, incrementando la producción total de AGV (Popova et al., 2011).

Por otra parte, se ha determinado que no existe relación entre la inhibición de la metanogénesis del rumen y las pérdidas de energía a través de la orina o por la producción de calor (Ungerfeld, EM. 2018).

#### 2.2.6. Degradación ruminal de las proteínas

Las partículas de alimento que ingresan en el rumen se someten a procesos de colonización de bacterias proteolíticas especializadas en la degradación de proteínas, que conllevan a la producción de estructuras más simples como aminoácidos (productos de la desaminación) y péptidos (obtenidos a través de peptidólisis). El inicio de la proteólisis y el acumulamiento de los productos finales de este proceso han sido cuestionados como reguladores en la degradación de proteínas a nivel ruminal (Bach, Calsamiglia, & Stern, 2015). Por otra parte, los protozoos que forman parte de la microbiota ruminal fagocitan moléculas grandes de proteína insoluble, proteínas, carbohidratos o incluso bacterias ruminales (Van Soest, 1994) por lo que en la reducción de poblaciones de protozoarios disminuye la concentración de N-amonio en el rumen ya que los protozoarios suministran proteínas solubles para sostener el crecimiento microbiano. La disponibilidad de energía en el rumen es un factor determinante para la utilización de los aminoácidos y péptidos que serán absorbidos en nivel intestinal. Cuando esta disponibilidad energética a nivel ruminal es reducida se activan rutas catabólicas para producir ATP y cubrir las necesidades de energía. Si existe disponibilidad de energía, los procesos de absorción continuarán con la síntesis protéica (Ørskov, 1994).

Factores que afectan la degradación de proteínas.

Componentes químicos, fisiológicos y nutricionales influyen en el crecimiento de los microbios del rumen. Los principales modificadores químicos y fisiológicos de la fermentación del rumen son el pH ruminal y la tasa de pasaje y estos dos factores a la vez, se ven afectados por la dieta y otras características nutricionales relacionadas, por ejemplo, el nivel de ingesta, las estrategias de alimentación, el tamaño de partícula y la calidad del forraje y las proporciones de forraje: grano. La cantidad y composición de carbohidratos y proteínas en la dieta también afectan el crecimiento microbiano (Hoover & Stokes, 1991).

Por otra parte, la degradación de las proteínas en el rumen depende de la conjugación de tres procesos catabólicos: la proteólisis, la péptidolisis y la desaminación.

Durante estos procesos intervienen enzimas endo y exopeptidasas que se encuentran en la superficie celular lo que facilita la interacción con los sustratos. Se ha observado que las exoenzimas no están sujetas al control metabólico, sin embargo, cualquier factor que altere su número o actividad metabólica influirá en la actividad proteolítica (Ruiz y Ayala 1987).

En lo que respecta a la energía se ha establecido que limita la síntesis de proteína en función de la cantidad liberada en los procesos ruminales. Por ejemplo, cuando se utiliza celulosa como única fuente de energía se ha observado un lento crecimiento celular, y esta respuesta depende de las cantidades de lignina que contenga el alimento. Contrariamente, la síntesis de proteína microbiana se incrementa por el suministro de carbohidratos fácilmente fermentables en las dietas, ejemplo el almidón. El nivel de consumo, también afecta al metabolismo de las proteínas en función de que al incrementar el nivel de consumo se reducen los costos energéticos de mantenimiento de los microorganismos a razón que se reduce su tiempo de permanencia en el rumen y se incrementa la tasa de pasaje (Rodríguez, Sosa, & Rodríguez, 2007).

Finalmente, los factores anti nutricionales pueden alterar el metabolismo de las proteínas, los más conocidos están los taninos, que están presentes en numerosas plantas en áreas tropicales. Basados en su estructura química y concentración en la dieta de rumiantes, los taninos pueden tener efectos positivos o negativos en las respuestas de los animales. Una disminución en el rendimiento es a menudo el resultado de una disminución en la ingesta cuando se alimentan las plantas ricas en tanino. Esta disminución a menudo se asocia con baja palatabilidad y puede ir acompañada de una disminución de la digestibilidad de la dieta y con una toxicidad potencial para el animal. El mayor suministro de proteínas de forrajes con alto contenido, se asocia con una disminución en la degradación de las proteínas del rumen por los taninos, puede dar como resultado un mejor rendimiento de los animales, excepto cuando se reduce la digestibilidad de las proteínas intestinales (Archimede et al., 2016).

#### 2.2.7. Metabolismo ruminal de las proteínas

En el rumen existen microorganismos (bacterias, hongos y protozoarios) con capacidad proteolítica (Bach et al., 2015) y recientemente han sido identificadas arqueas metanogénicas (Patra & Saxena, 2009).

El flujo de proteína desde el rumen es un factor determinante en los procesos productivos del animal, esta proteína tiene origen dietario y microbiano. La cantidad de este flujo de proteínas está estrechamente relacionada con el grado de proteólisis en el rumen y la síntesis de proteína microbiana. (Egan & Ulyatt, 1980). Consecuentemente la disminución de la degradación proteica en el rumen será inversamente proporcional con la digestibilidad de proteína en el intestino delgado.

En este sentido, a través del tiempo, los modelos nutricionales (NRC, AFRC, INRA) han tomado en cuenta las proteínas suministradas en la dieta, y el nitrógeno endógeno y reciclado. La proteína de origen dietario se divide en proteínas degradables y no degradables en el rumen, con proteínas rápidamente degradables compuestas por nitrógeno no protéico y proteínas verdaderas. La proteína verdadera se degrada en péptidos y aminoácidos que eventualmente se desaminan en N-amoniaco o incorporadas para la síntesis de proteína microbiana. El nitrógeno no protéico está constituido por N presente en el ADN, ARN, amonio, aminoácidos, y pequeños péptidos utilizados para el crecimiento microbiano. Las pérdidas de nitrógeno pueden reducirse disminuyendo la degradación de las proteínas en el rumen y/o incrementando el uso de N por los microorganismos ruminales (Bach et al., 2015).

El flujo de proteína de origen microbiano al intestino delgado es un proceso en el cual alrededor del 66 – 75 % se absorben y son utilizadas para la síntesis y absorción de aminoácidos y proteína metabolizable (AFRC, 1992). Se ha reportado que la proteína no degradada en el rumen de origen dietario, es una fuente casi similar (64%) a la proteína microbiana, para la síntesis de proteína metabolizable, sin embargo, estas diferencias pueden estar ligadas a la ineficiencia del rumen en el aprovechamiento de la proteína de origen dietario (con dietas altas y bajas en proteína), por lo que se recomienda predecir o evaluar la cantidad de proteína microbiana producida (Dewhurst et al., 2000).

#### 2.2.8. Síntesis de proteína microbiana.

Los aminoácidos producidos por los microorganismos en el rumen, son absorbidos y metabolizados en el intestino delgado del rumiante. La cantidad de proteína de origen bacteriano que llega al intestino depende de dos factores. Por un lado, en la medida en que una dieta balanceada aporta mayor cantidad de energía estimula la división microbiana, aumentando su concentración en el rumen y por lo tanto su llegada al intestino. Y, por otro lado, las bacterias requieren dos sustratos para sintetizar sus proteínas somáticas, siendo estos las cadenas carbonadas y una fuente de nitrógeno. De esta forma, la producción ruminal de proteína puede verse afectada por desbalances entre ambos sustratos (Relling & Mattioli, 2008).

El flujo de proteína microbiana expresada en g N/kg DMOF (Digestibilidad de la Materia Orgánica Fermentable), varía entre 14 y 60 g N/ DMOF (ARC, 1984).

Los métodos para su determinación han sido revisados ampliamente (Makkar & Mcsweeney, 2005). Sin embargo, en diferentes estudios han presentado gran variación la misma que estaría influenciada por diversos factores relacionados con la dieta y/o el entorno del rumen (Jayanegara et al, 2012; Mcsweeney & Krause, 2001). Los efectos de muchos de estos factores aún no se han demostrado de forma concluyente ni se han definido cuantitativamente.

En este sentido, Piñeiro-Vázquez et al., (2017) menciona que la adición de taninos condensados no favoreció la retención de nitrógeno en el organismo y que la excreción de N en las heces aumentó y disminuyó la excreción de N en la orina, atribuyendo estos resultados a la naturaleza química de los taninos. En el mismo sentido, Abarghuei et al, (2011), menciona que 69,7 g/kg de taninos hidrolizados equivalente a gallo taninos encontrados en *Quercus Libani* Oliv. disminuyeron la producción de N microbiano de 3.15 g/día a 2.46 g/día comparados con una dieta control. Por su parte, Wischer et al, (2014), reportó un incremento en la excreción de N fecal y paulatinamente una reducción en el nitrógeno urinario al utilizar dietas con extracto de castaño ricos en metabolitos secundarios (79.1 % MS de fenoles totales y 68.6 % MS taninos fenólicos).

Sin embargo, estos resultados estarían relacionados con la concentración de taninos como lo demostró Yildiz et al, (2005) donde encontraron que el flujo de N microbiano del rumen no se vio afectado cuando las ovejas se alimentaban con niveles bajos de taninos condensados encontrados en hojas de roble que contenían 11 g /kg MS, sugiriendo que los taninos canalizan una mayor proporción de nutrientes disponibles a la síntesis de masas microbianas y menos a la producción de ácidos grasos de cadena corta.

En lo que respecta a los derivados de purina, se menciona que la variabilidad de éstos compuestos en orina pueden verse influenciados por la baja calidad del alimento y concentraciones del 4% de TC /kg de MS especialmente en la excreción de alantoína (Piñeiro-Vázquez et al., 2017). Sin embargo Wischer et al., (2014) no encontró diferencias en la excreción de alantoína (entre 9.0 y 12.1 mmol/día) al utilizar extractos de castaño ricos en taninos. Estos resultados son distintos al utilizar fuentes de taninos hidrolizables (Abarghuei et al., 2011).

El principio de su determinación de la síntesis de proteína microbiana se basa en que los ácidos nucleicos que salen del rumen son esencialmente de origen microbiano. Esto como consecuencia a que los alimentos para rumiantes por lo general presentan un bajo contenido de purina, la mayoría de los cuales sufren una degradación extensa en el rumen como resultado de la fermentación microbiana. Las purinas de ácido nucleico absorbidas se degradan y se excretan en la orina como sus derivados. Estos derivados son: hipoxantina, xantina, ácido úrico y alantoína. La excreción de estos derivados de purina está directamente relacionada con la absorción de purina. Con el conocimiento de la proporción de N-purina: N-total en la biomasa microbiana, la absorción de N de origen microbiano se puede calcular a partir de la cantidad de purina absorbida que se estima a partir de la excreción urinaria de los derivados de purina (Chen & Gomes, 1992).

Los ácidos nucleicos microbianos que salen del rumen se someten a una extensa digestión en el intestino delgado. No se produce digestión aparente en el abomaso. En el intestino delgado, los nucleótidos de purina se hidrolizan en nucleótido de purina y bases libres. Ambas formas pueden ser absorbidas desde el intestino. Se puede considerar que su digestibilidad es similar a la de los ácidos nucleicos, ya que las nucleótidas de purina y

las bases libres se pueden absorber fácilmente. La digestibilidad de los ácidos nucleicos microbianos es de alrededor del 85% (Chen & Gomes, 1992).

#### 2.2.9. Metabolismo ruminal de los lípidos

Al referirnos sobre el metabolismo de los lípidos en el rumen debemos considerar dos aspectos relacionados entre sí, que son: el metabolismo microbiano de los lípidos de origen dietario y de la síntesis de novo por parte de los microbios que generan sus propios lípidos usando como sustratos ácidos grasos de cadena corta (Harfoot, 1981). La utilización de ácidos grasos para el metabolismo por bacterias anaerobias está restringida. Los organismos del rumen tienen una capacidad limitada para usar sustancias altamente reactivas para obtener energía, y el uso de ácidos grasos se limita a la incorporación de células y para fines sintéticos (Van Soest, 1994).

El metabolismo microbiano de los galactolípidos y triglicéridos comienza por la separación de los residuos de galactosa, luego hidrolizando los ácidos grasos de glicerol, posteriormente el glicerol y las porciones de galactosa se fermentan fácilmente en ácidos grasos volátiles (Van Soest, 1994).

La digestión de las grasas en el rumen inicia con procesos de hidrólisis realizadas por lipasas bacterianas, ubicadas en la superficie de los microorganismos, por lo cual las bacterias necesitan adherirse a la superficie del alimento. Como principales productos de la hidrólisis se liberan ácidos grasos y glicerol, sumados a alcoholes aminados derivados de los fosfolípidos y galactosa de los galactolípidos. Estos últimos junto con el glicerol son metabolizados y convertidos en AGV, que se absorben por la pared ruminal.

Posteriormente, los ácidos grasos insaturados sufren un proceso de hidrogenación microbiana. Esta hidrogenación no es completa, afecta entre el 70 y el 90 % de los ácidos grasos y es realizado especialmente por bacterias adheridas al alimento. El proceso de biohidrogenación es importante, ya que los ácidos grasos al ser moléculas bipolares disminuyen la digestibilidad de los alimentos, debido a que los extremos hidrofílicos se adhieren al alimento dejando expuesto los extremos hidrofóbicos, lo que dificulta el acceso de las enzimas digestivas bacterianas. Además, los ácidos grasos insaturados alteran la tensión superficial y la permeabilidad de las membranas bacterianas, perjudicando especialmente a la flora celulolítica. Los remanentes y productos intermedios de la biohidrogenación, tienen funciones metabólicas en los animales (Relling & Mattioli, 2008).

El nivel de hidrogenación se reduce cuando se alimenta con dietas altas en concentrados, lo que puede atribuirse a la inhibición de la lipólisis al bajo pH que se observa típicamente en estas dietas (Van Nevel & Demeyer, 1995).

La biohidrogenación que sufren los aceites esenciales resulta también útil al inactivar ciertos compuestos tóxicos como alcaloides, fenoles y estrógenos vegetales, y representa

para el organismo un ahorro de vitamina E, encargada de proteger a los ácidos grasos insaturados de los procesos oxidativos (Jouany & Morgavi, 2007).

Si bien las cantidades ordinarias de lípidos insaturados, como aparecen en los forrajes, no son importantes en la fermentación del rumen, el exceso de ácidos grasos insaturados y triglicéridos puede causar una profunda alteración en el equilibrio de la fermentación mediante la supresión de las bacterias metanogénicas y celulolíticas. El aceite insaturado que se dosifica en pequeñas cantidades frecuentes es mucho menos probable que cause supresión del metano que si se administra en una sola dosis grande, sin embargo, puede haber un umbral de tolerancia por la fermentación. La administración del aceite a través de la alimentación distribuida puede dar tiempo para el metabolismo y la hidrogenación de los ácidos grasos insaturados antes de que pueda ocurrir la inhibición. En este sentido, Santana et al, (2017) mostró que la reducción en la frecuencia de suplementación de aceite de soya, de una administración diaria a una suplementación cada 48 horas en condiciones de pastoreo no mostró efectos sobre la población microbiana del rumen ni en la fermentación ruminal, además aumentó la concentración de ácido propiónico y disminuyó la relación acético: propiónico, que es un indicador de la mejora de la eficiencia de la utilización de energía ruminal.

Los ácidos grasos insaturados no compiten con la producción de metano por el hidrógeno disponible. Sin embargo, puede producir una alteración en la fermentación. La alteración de la fermentación produce un exceso de hidrógeno y una alteración resultante en el equilibrio de la fermentación del rumen hacia la producción de una alta proporción de propionato para mantener el equilibrio de la fermentación (Ungerfeld et al, 2005).

El tipo de dieta y los cambios en el ambiente del rumen pueden cambiar las vías de biohidrogenación, lo que resulta en cambios dramáticos en los ácidos grasos intermedios, causando depresión de la grasa en la leche (Bauman & Griinari, 2003).

Los ácidos grasos insaturados se encuentran entre las sustancias que se han sugerido como aditivos para eliminar la fermentación de metano para reducir la pérdida de fermentación y aumentar la eficiencia animal (Dong et al, 1997), sin embargo los resultados encontrados en experimentos *in vivo* e *in vitro* aun no son concluyentes.



### 2.3. LEGUMINOSAS ARBÓREAS Y ARBUSTIVAS DEL ECUADOR

El Ecuador es un país latinoamericano con una extensión de 283 561 km<sup>2</sup> que posee una amplia variedad de pisos climáticos que se conjugan en ambientes tropicales y fríos (INEC).

La familia de *Leguminosae* constituye una de las familias más grandes de reino vegetal, se distribuye en todo el mundo e incluye árboles, arbustos, hierbas y lianas. La familia ha sido dividida en tres subfamilias, consideradas por algunos botánicos como familias: *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* y *Papilionoideae*. La subfamilia *Papilionoideae* es la mayor dentro del grupo de las *Leguminosae* y se encuentra distribuida ampliamente en las regiones tropicales y templadas (Espinoza & León, 2002).

Las leguminosas que fueron parte de este estudio, se encuentran en un clima tropical y presentan entre 0.23 % – 1.71 % de taninos condensados. Mientras que las leguminosas arbóreas de clima frío muestran entre 0,35% y-3,45 % de taninos concentrados (usando catequina como patrón en ambos casos).

Varios estudios (Toral et al., 2016; Díaz et al, 2015; Pal et al, 2015; Rira et al., 2015), han demostrado que los extractos de plantas, compuestos secundarios de plantas leguminosas y hojas de árboles que contienen taninos han sido utilizados para la modulación de las funciones del rumen, especialmente la reducción de las producciones de metano entérico. Las hojas de los árboles, que contienen taninos y saponinas en cantidades variables, pueden incorporarse en las dietas para mitigar las emisiones de metano entérico (Patra & Saxena, 2010). Las hojas de árboles y árboles son importantes recursos de alimentación para la producción de pequeños rumiantes en los países con sistemas de producciones basadas en pastoreo (Devendra, 1990).

En el Ecuador, predomina la utilización de monocultivos de gramíneas, en sistemas extensivos caracterizados por la utilización de carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa) (Muñoz-Espinoza et al, 2016) donde el pastoreo es la base de alimentación y la dependencia de los concentrados comerciales para la suplementación en el ganado bovino son las características principales de la región Sierra.

Las hojas de algunas arbóreas tropicales como *S. cumini*, *F. religiosa*, *A. nilotica* y *A. indica* presentan un bajo potencial de producción de metano expresado en términos de MO degradable, además favorecen la producción de biomasa microbiana y tienen mayor degradabilidad de MO. Consecuentemente podrían ser utilizadas para la mitigación de metano en sistemas de producción de pequeños rumiantes para países tropicales en desarrollo, donde las hojas de árboles podrían usarse como alimentos suplementarios para forrajes de baja calidad (Pal et al., 2015).

En este sentido, los sistemas agrosilvopastoriles han demostrado que incrementan las ganancias de peso de hasta 106 g/día en ovinos en contraste con aquellos alimentados con sólo gramíneas, 70 g/día (Barros-Rodríguez et al., 2012) lo que justifica buscar estrategias de alimentación enfocadas a mejorar los métodos de explotación pecuarios y que sean sostenibles en el tiempo.

### Leguminosas arbóreas y arbustivas del trópico

Las leguminosas arbóreas y arbustivas tropicales, han sido utilizadas para reducir la producción de metano entérico en rumiantes en hasta un 20% menos comparadas con leguminosas de clima frío (Archimède et al., 2011), efecto relacionado a su mayor composición de metabolitos secundarios y la modulación sobre la función ruminal.

Las leguminosas arbóreas y arbustivas utilizadas en este estudio (tabla 1) pertenecen a un clima tropical ubicada en a región amazónica de Ecuador a 790 msnm, situada en 1° 28' 0.8" Sur y 77° 59' 45" Oeste según el sistema de posicionamiento global (GPS).

**Tabla 1.** Leguminosas arbóreas y arbustivas de clima tropical utilizadas en la alimentación de ganado en Ecuador

| Clima               | Nombre científico            | Nombre común     | Familia         | Constitución |
|---------------------|------------------------------|------------------|-----------------|--------------|
| Tropical<br>(790 m) | <i>Clitoria arborea</i>      | Mariposa         | <i>Fabaceae</i> | arbórea      |
|                     | <i>Erythrina fusca</i>       | Gallito          | <i>Fabaceae</i> | arbórea      |
|                     | <i>Bauhinia forficata</i>    | Pata de vaca     | <i>Fabaceae</i> | arbustiva    |
|                     | <i>Erythrina poeppigiana</i> | Eritrina gigante | <i>Fabaceae</i> | arbórea      |
|                     | <i>Cratylia argentea</i>     | Cratilia         | <i>Fabaceae</i> | arbustiva    |
|                     | <i>Gliricidia sepium</i>     | Mataratón        | <i>Fabaceae</i> | arbórea      |
|                     | <i>Cassia tora</i>           | Senna            | <i>Fabaceae</i> | arbustiva    |
|                     | <i>Flemingia macrophylla</i> | Flemingia        | <i>Fabaceae</i> | arbustiva    |

#### 2.3.1. *Clitoria arborea*

Esta especie pertenece a la familia de las *Fabaceae*, subfamilia *Papilionoideae*, que presenta un parénquima fusiforme en su leño (Espinoza & León, 2002).

Su nombre común es árbol del guisante mariposa es un árbol de más de 10 m de altura (figura 7). Está estrechamente relacionado con la enredadera Mariposa Guisante. Las hojas son pinnadas compuestas con grandes folíolos elípticos. Las flores son grandes, de color rosa, con forma de mariposa. El árbol del guisante de mariposa es originario de Brasil, Bolivia y Perú (Kamath, 2012).



**Fig. 7.** *Clitoria arborea*.

### 2.3.2. *Erythrina fusca*

Especie perteneciente a la familia de las *Fabaceae*, subfamilia *Papilionoideae* (Espinoza & León, 2002). Su altura está entre los 8 y 20 m (figura 8), sus hojas son alternas, palmaticompuestas, trifolioladas, con pecíolos de 9-13 cm, raquis de 7-25 cm. Flores anaranjado-pálidas, con frutos de 14-33 cm. Son árboles hermafroditas, caducifolios, con la copa densa y subglobosa; troncos más o menos cilíndricos en sección transversal, la corteza grisácea y armada con aguijones agudos y subpiramidales. Nativo de México a Bolivia, Venezuela y las Antillas. Se encuentran en bosques húmedos, muy húmedos, pluviales y secos (UICN, 2018).



**Fig. 8.** *Erythrina fusca*, Fuente: (UICN, 2018).



### 2.3.3. *Bauhinia forficata*

Es una arbustiva, con una altura entre 2 y 4 m (figura 9). Sus hojas son alternas, simples, bilobuladas, de 6-12 x 4-8 cm, ovadas, con lóbulos agudos o largamente acuminados. Presenta inflorescencias con racimos elongados de 5-12 cm. Sus flores son blancas que se tornan rosadas con la edad. Sus frutos son de 15-30 cm, lineares, pardos, curvados y largamente estipitados. De igual forma son arbustos hermafroditas, subcaducifolios; con una copa densa y subglobosa; los troncos más o menos cilíndricos en sección transversal, sin contrafuertes prominentes; la corteza externa pardo-grisácea, fisurada, que se exfolia en placas alargadas e irregulares.

Originario del sur de México a Bolivia, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú y Venezuela. Se desarrolla en bosques húmedos y secos (UICN, 2018).



**Fig. 9.** *Bauhinia forficata*, Fuente: (Trópicos Ecuador Project, 2018)

#### 2.3.4. *Erythrina poeppigiana*

Leguminosa perteneciente a la familia de las *Fabaceae*, su nombre común es eritrina gigante. Son especies perennes. Sus árboles muestran nódulos, tallos erectos o ascendentes. Sus tallos son de más de 2 m de altura, tronco o tallos armados con espinas (figura 10). Sus hojas son alternas, pecioladas, con hojas pinnadamente trifolioladas. Sus inflorescencias se presentan en racimos, como una inflorescencia axilar y terminal con brácteas muy pequeñas, ausentes o caducas. Flores zigomorfas. Su cáliz presenta 2 labios y 2 lóbulos. Sus pétalos son en forma de garra de color rojo, naranja o amarillo. Su fruta es estipulada y unilocular (Trópicos Ecuador Project, 2018).



**Fig. 10.** *Erythrina poeppigiana*

#### 2.3.5. *Cratylia argentea*

El género *Cratylia* pertenece a la familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionoideae*, tribu *Phaseoleae* y subtribu *Diocleinae*; crece en forma de arbusto de 1.5 a 3.0 m de altura o en forma de lianas volubles (figura 11). Las hojas son trifoliadas y estipuladas, los folíolos son membranosos o coriáceos con los dos laterales ligeramente asimétricos; la inflorescencia es un pseudoracimo nodoso con 6 a 9 flores por nodosidad; las flores varían



en tamaños de 1.5 a 3.0 cm con pétalos de color lila y el fruto es una legumbre dehiscente que contiene de 4 a 8 semillas en forma lenticular, circular o elíptica. Se considera a *Cratylia* como un género neotropical de origen reciente, cuya distribución natural se sitúa al sur de la cuenca del río Amazonas y al este de la cordillera de los Andes, abarcando partes de Brasil, Perú, Bolivia y la cuenca del río Paraná al nordeste de Argentina. El hábito de crecimiento de *C. argentea* es de tipo arbustivo en formaciones vegetales abiertas, pero puede convertirse en liana de tipo voluble cuando está asociada a plantas de porte mayor. La especie ramifica desde la base del tallo y se reportan hasta 11 ramas en plantas de 1.5 a 3.0 m de altura. Las hojas tienen consistencia papirácea con abundante pubescencia en el envés en plantas provenientes del Cerrado brasileño, pero suaves y glabras en poblaciones que se encuentran en Santa Cruz de la Sierra en Bolivia (Argel & Lascano, 1995).



**Fig. 11.** *Cratylia argentea*

#### 2.3.6. *Gliricidia sepium*

*Gliricidia sepium* es un árbol de tamaño mediano que crece de 10 a 12 metros de altura (figura 12). La corteza es suave, y su color puede variar desde un gris blanquecino hasta un marrón rojizo profundo. Tiene hojas compuestas que pueden tener una longitud de 30 cm. Cada hoja está compuesta de hojuelas de aproximadamente 2 a 7 cm de largo y 1 a 3 cm de ancho. Las flores están ubicadas en el extremo de las ramas que no tienen hojas. Estas flores tienen un color rosado brillante a lila que está teñido de blanco. Un punto amarillo pálido es generalmente en la base de la flor. La fruta del árbol es una vaina de unos 10 a 15 cm de largo. Es verde cuando no está maduro y se vuelve de color marrón

amarillento cuando alcanza la madurez. La vaina produce 4 a 10 semillas redondas de color marrón. *G. sepium* es nativo de bosques tropicales secos en México y América Central. Además de su área de distribución nativa, se cultiva en muchas regiones tropicales y subtropicales, como el Caribe, las partes del norte de América del Sur, África central, partes de la India y el sudeste asiático (Trópicos Ecuador Project, 2018).



**Fig. 12.** *Gliricidia sepium*

#### 2.3.7. *Cassia tora*

Leguminosa arbustiva de crecimiento medio (figura 13), perteneciente a la familia *Fabaceae*. Sus flores crecen en racimos terminales de color amarillo. Florece durante todo el año. Sus frutos se desarrollan en una vaina plana y comprimida de color marrón cuando maduran. Sus semillas se presentan en un gran número y son de forma oblonga y longitudinales. La fructificación se realiza durante todo el año. El ápice de sus hojas son apiculadas con márgenes de la hoja entera, la forma de sus hojas es obovadas. El tipo de hojas es paripinada (Trópicos Ecuador Project, 2018).





**Fig. 13.** *Cassia tora*. Fuente: (Trópicos Ecuador Project).

#### 2.3.8. *Flemingia macrophylla*

El género *Flemingia* forma parte de la familia *Fabaceae*, subfamilia *Faboideae*. *F. macrophylla* es un arbusto leñoso (figura 14), que forma mechones, erecto o postrado, de hasta 3 m o 4 m de altura, con una corona esparcida, ramas jóvenes sedosas y raíces profundas. Las hojas son digitalmente trifolioladas, las valvas subcoriáceas, oblongas de 10-15 cm de largo, acuminadas y redondeadas en la base. Sus pecíolos son de 3-10 cm de longitud. Sus inflorescencias son principalmente axilares, en racimos densos de 5-30 cm de largo.

Sus flores tienen pedicelos muy cortos, rojos o morados; brácteas lanceoladas, de 5 cm de longitud. Presentan vainas cilíndricas de 8 a 12 mm de largo y 5 mm de ancho, cubiertas con vello glandular fino, dehiscentes, de color marrón oscuro, con 2 semillas. Sus semillas son globulares de 2 mm de diámetro, brillantes, negras. Las raíces a menudo son noduladas (Trópicos Ecuador Project).





**Fig. 14.** *Flemingia macrophylla*

#### Leguminosas arbóreas y arbustivas de clima frío del Ecuador

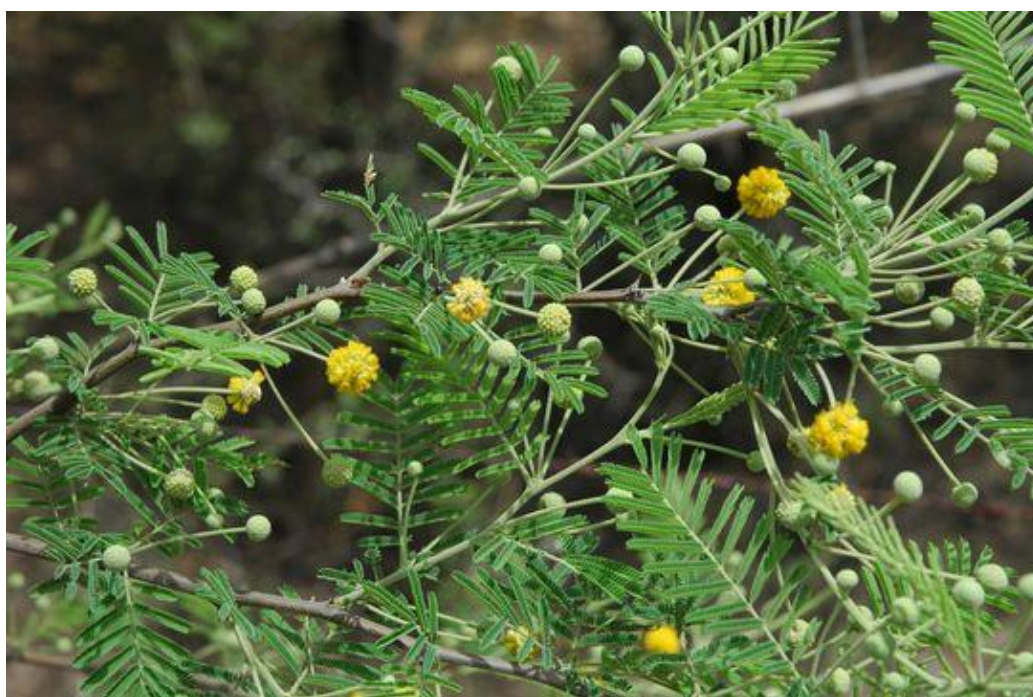
Las leguminosas arbóreas y arbustivas utilizadas en este estudio (tabla 2) pertenecen a clima frío de Ecuador, situados en la región interandina a una altura entre 2500 - 2800 msnm.

**Tabla 2.** Leguminosas arbóreas y arbustivas de clima frío utilizadas en la alimentación de ganado en Ecuador

| Clima                   | Nombre científico            | Nombre común     | Familia      | Constitución |
|-------------------------|------------------------------|------------------|--------------|--------------|
| Clima Templado (2800 m) | <i>Acacia dealbatha</i>      | Aromo            | Fabaceae     | arbórea      |
|                         | <i>Acacia melanoxylon</i>    | Acacia negra     | Fabaceae     | arbórea      |
|                         | <i>Albizia lophantha</i>     | Albicia amarilla | Fabaceae     | arbórea      |
|                         | <i>Lupinus pubescens</i>     | Falso chocho     | Fabaceae     | arbustiva    |
|                         | <i>Inga insignis</i>         | Guaba del valle  | Fabaceae     | arbórea      |
|                         | <i>Senna multiglandulosa</i> | Retama           | Bignoniaceae | arbustiva    |
|                         | <i>Tecoma stans</i>          | Cholán           | Bignoniaceae | arbustiva    |

### 2.3.9. *Acacia dealbatha*

La *Acacia dealbatha* conocido como el aroma de *Vachellia* es un árbol pequeño, perenne y espinoso (figura 15), originario de Perú, Chile, Argentina y Paraguay. Algunos nombres comunes para ello son Aromita, Aromo Negro, Espinillo y Tusca. No está listado como una especie amenazada. Esta especie arbórea mide entre 10-12 m de altura, es perenne, de crecimiento rápido, su corteza es grisácea o blanca y lisa, muy ramificada. Sus ramas son angulosas y pubescentes. Presenta unas hojas bipinnadas de 8-20 cm, cada una de ellas con 25-40 pares de folíolos. Sus inflorescencias presenta un glomérulo globoso con más de 25 flores, muy olorosas. Sus pedúnculos son pubescentes.



**Fig. 15.** *Acacia dealbatha* o aroma, Fuente: (Trópicos Ecuador Project, 2018).

### 2.3.10. *Acacia melanoxylon*

Especie arbórea conocida comúnmente como acacia negra (figura 16), presenta una copa densa y piramidal a cilíndrica, a veces con pocas ramas muy pesadas. Tiene un sistema radicular extenso y denso, con raíces fuertes superficiales. Las hojas son bipinnadas en las plantas o ramas jóvenes. Las plantas adultas, en cambio, reemplazan las hojas por filodios. Los filodios tienen de 7 a 10 cm largo, son grisáceos a verde negruzcos, rectos a suavemente curvos, con 3 a 7 venas prominentes longitudinales y finas venas entre ellos; bipinnadas en plantas jóvenes. Las flores son de color amarillo pálido. Se disponen en cabezuelas globulares. Los frutos son vainas de color pardo-rojizo, retorcidas, más angostas que los filodios. Las semillas son chatas, redondeadas, negras, de 2 a 3 mm longitud (Trópicos Ecuador Project, 2018).





**Fig. 16.** *Acacia melanoxylon*, Fuente: (Trópicos Ecuador Project, 2018)

#### 2.3.11 *Albizia lophantha*

Llamada también *Paraserianthes lophantha* es una especie de leguminosa de la familia de las *Fabaceae*.

También se conoce como Albicia Amarilla, Acacia plumosa o Albizia de plumas. Es originaria de Sudamérica (figura 17).

En su etapa adulta puede llegar a medir entre 4 a 7 metros. Su floración se produce en invierno, siendo estas flores de pelusa de color amarillo y en forma de tubo. El follaje es perenne. Esta especie muy parecida a la *Albizia julibrissin*, diferenciándose de esta por la tonalidad de las flores, ya que es esta son de colores rojo y amarillo (Trópicos Ecuador Project, 2018).



**Fig. 17.** *Albizia lophantha*, Fuente: (Trópicos Ecuador Project, 2018)

#### 2.3.12. *Lupinus pubescens*

Especie perteneciente a la familia de las Fabaceae, su nombre común es ashpa chocho. Es una especie herbácea nativa conocida con el nombre de ashpa chocho o allpa chocho, fue nombrada para la ciencia en 1846 como *Lupinus pubescens*. Esta especie está distribuida en Venezuela, Ecuador y Colombia. En Ecuador se la ha reportado hasta la provincia de Azuay, desde los 2000 hasta los 4000 msnm. Es una hierba terrestre o subarbusto, perenne, de hasta 80 cm de alto (figura 18). Es pubescente, con hojas compuestas en grupos de hasta 9 foliolos, oblongos-lanceolados. Inflorescencia racimosa, axilar. Sus flores son de color violeta intenso con blanco, bracteola corta, con labio superior emarginado e inferior entero con corola glabra. El fruto es una legumbre y sus semillas usualmente aplanadas. Sus hojas y flores son utilizadas como alimento para el ganado (Trópicos Ecuador Project, 2018).





**Fig. 18.** *Lupinus pubescens*, Fuente: (Trópicos Ecuador Project, 2018).

#### 2.3.13. *Inga insignis*

Especie arbórea perteneciente a la familia de las Fabaceae. Se encuentra distribuida en Colombia y Ecuador. En nuestro país se la reportado en las provincias de Pichincha y Azuay; entre los 1500 y 3000 msnm. Árbol de hasta 12 m de altura (figura 19), ramas glabras o pubescentes. Hojas pinnadas con 4–5 o más pares de folíolos, raquis terete o alado, glándulas presentes en la inserción de los folíolos; pecíolo terete o alado; estípulas caducas. Inflorescencias en racimos axilares o terminales.

Flores blancas o amarillas; cáliz tubular con 5 lóbulos triangulares; corola tubular con 5 lóbulos, usualmente pilosa; estambres numerosos. Sus frutos son legumbres cortas, coriáceas, surcadas, de color café, semillas con arilo succulento. El arilo de sus frutos es comestible. De su tallo se usa la madera para vigas en la construcción de viviendas y para la elaboración de instrumentos de labranza. Se utiliza además como leña y para la fabricación de carbón. Sirve en sistemas agroforestales para dar sombra a otras especies y se lo debe promover para la ornamentación de la ciudad (Trópicos Ecuador Project, 2018).



**Fig. 19.** *Inga insignis*

#### 2.3.14. *Senna multiglandulosa*

Arbusto de unos 2 m de altura a veces árbol pequeño (figura 20), densamente provisto de follaje y usualmente muy ramificado desde la base, con el fuste corto, irregular, nudoso y la corteza agrietada de color marrón claro. Es distinguible por su follaje pubescente y sus flores de color amarillo.

Se propaga por siembra directa. Está distribuida desde México hasta Argentina. En Perú, se extiende en toda la Sierra, de Cajamarca a Puno. Es frecuente en la Sierra Central (Valle del Mantaro), entre los 2300 a 4000 msnm, prefiere los suelos francos a franco-arenosos, aún con pedregosidad alta; necesita niveles medios a altos de humedad; es, sin embargo, una especie altamente adaptable y apreciada en la conformación de cercos vivos para el cobijo de los cultivos y en las prácticas de conservación de suelos (Trópicos Ecuador Project, 2018).





**Fig. 20.** *Senna multiglandulosa*, Fuente: (Trópicos Ecuador Project, 2018).

#### 2.3.15. *Tecoma stans*

Especie perteneciente a la familia de las *Bignoniaceae*, es una arbustiva de 4, 6, o 10 metros de altura (figura 21), con una corteza de color castaño oscuro, rugosa y fibrosa; ramillas redondeadas, escamosas. Hojas de hasta 25 cm de largo, imparipinadas, con 3, 9 u 11 foliolos de elíptico-ovalados a estrechamente elíptico-oblongos o lanceolados, de 3-14 x 1-6 cm, en el terminal de mayor tamaño que los laterales, con la base cuneada y ligeramente decurrente en el peciolo, asimétrica en los foliolos laterales, el margen aserrado, y el ápice agudo o acuminado; son de textura membranácea, algo pubérulos en los nervios; peciolo de 2,5 – 9 cm de largo, con un surco en el haz; peciólulus de 0 – 2 mm de largo en los foliolos laterales y de 6 – 18 cm de largo en el foliolo terminal.

Sus inflorescencias en racimos o panículas terminales o subterminales, más o menos erectas, con 8-20 flores, aunque solo unas pocas abren al mismo tiempo, sobre pedúnculos de 1 – 3cm de longitud. Sus flores sobre pedicelos lepidotos de 3 – 8 mm de largo, con el cáliz cupuliforme, de 4 – 7 mm de largo, ciliado en el margen, con 5 dientes agudos o apiculados hasta 2 mm de largo, no persistente en fruto; corola tubular-acampanada, amarilla con líneas rojizas en la garganta, de 3, 5, 7 cm de longitud y de 1,2 – 2,4 cm de anchura en la garganta, glabra externamente, con el tubo de 3 – 4,3 cm de largo y el limbo con 5 túbulos desiguales, redondeados, de 1,5 x 1,8 cm. Su fruto se presenta en cápsula, linear, cilíndrico o ligeramente comprimido, de 7 – 21 cm de largo, estrechado en ambos

extremos, glabro, de color marrón pálido en la madurez. Sus semillas de 3 – 5 cm, con alas translúcidas bien destacadas del cuerpo de la semilla (Trópicos Ecuador Project, 2018).



**Fig. 21.** *Tecoma stans*



### **CAPÍTULO 3. OBJETIVOS Y ESQUEMA DE TESIS**

### **3. OBJETIVOS Y ESQUEMA DE TESIS**

Los objetivos que fueron evaluados en el presente estudios fueron:

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el consumo voluntario de forrajes ricos en compuestos secundarios; su efecto sobre la producción de metano entérico, fermentación ruminal y síntesis de proteína microbiana en ovinos

#### **3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Determinar el contenido nutricional y de compuestos secundarios en forrajes arbóreos de clima templado y tropical.
- Estudiar el efecto de los forrajes ricos en compuestos secundarios sobre las funciones del rumen y producción de metano entérico in vitro.
- Evaluar el efecto del consumo de un forraje arbóreo sobre el comportamiento productivo y fermentación ruminal en ovinos.

A continuación, la estructura de la presente tesis hace referencia en primer lugar al capítulo de materiales y métodos aplicados para el desarrollo de cada uno de los objetivos planteados anteriormente. Por otro lado, se muestra el capítulo de resultados y discusión organizados en subcapítulos que corresponden a los tres resultados obtenidos durante el trabajo de investigación.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Metodología objetivo 1

Inicialmente se recogieron muestras de aproximadamente 500 g de hojas verdes de cada especie de leguminosas de clima tropical (tabla 1). El muestreo se realizó durante los meses de enero y febrero correspondiente a la época de lluvias. La humedad relativa del sector es de 75% - 80% y la precipitación media anual es de aproximadamente 3164 mm.

Las muestras de aproximadamente 500 g de hojas verdes de las leguminosas de clima frío (tabla 2) se recogieron (figura 22), durante los meses de febrero y marzo correspondiente a la época de lluvias. La humedad relativa del sector es de 55% - 60% y la precipitación media anual es de aproximadamente 1390 mm.

Posteriormente las hojas de todas las especies se secaron en una estufa a 60° C durante 72 h. Se redujo el tamaño de la partícula usando un molino de martillo con un tamiz de 1 mm. Finalmente las muestras se almacenaron para su posterior análisis químico y ensayos *in vitro*.



**Fig. 22.** Recolección de hojas de leguminosas arbóreas y arbustivas

## Análisis químico

El contenido de materia seca (ID 934.01), ceniza (ID 942.05) y nitrógeno (ID 990.03) fueron analizados según la AOAC (1999). La fibra detergente neutra (NDF) y la fibra detergente ácida (ADF) se midieron secuencialmente utilizando la misma muestra en bolsas de filtro y se expresaron sin incluir ceniza residual según Van Soest et al. (1991), usando un analizador de fibra ANKOM220 (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, EE. UU). La FDN se determinó utilizando una amilasa termoestable. La lignina detergente ácida (LDA) se determinó por solubilización de celulosa con ácido sulfúrico (72%) de acuerdo con Van Soest et al. (1991).

Para la determinación de fenoles totales y taninos condensados las muestras se sometieron a un proceso de extracción con solución acuosa de acetona al 70%, durante 6 horas y agitación; a la solución de acetona se le añadió 0,1 % (p/v) de ácido ascórbico como antioxidante. Después de filtrar y eliminar la acetona en rota vapor, el concentrado acuoso se extrajo (dos veces) con acetato de etilo para eliminar las sustancias contaminantes de bajo peso molecular (Hussein et al., 1990).

La fase acuosa con los taninos se sometió a un proceso de sucesivas congelaciones y descongelaciones para precipitar las proteínas extraídas (Marquardt & Campbell, 1973). Después de filtrar el extracto fue liofilizado y el producto resultante introducido en recipientes con cierre hermético y conservado a -20°C.

Los taninos condensados se midieron por el método de ácido de cloruro de vanilina usando catequina como patrón, mientras que el contenido de fenoles totales se determinó, utilizando el reactivo de Folin-Denis y el ácido tánico como patrón (Ortiz et al., 1993).

### 4.2. Metodología objetivo 2.

Con las muestras secas, molidas y tamizadas (1 mm) anteriormente de todas las especies leguminosas tanto de clima tropical como de clima frío, se procedieron a realizar las incubaciones *in vitro*.

#### Incubaciones *in vitro*

El líquido ruminal para las incubaciones *in vitro* se obtuvo de cuatro ovejas inmediatamente antes de la alimentación de la mañana. Las incubaciones se realizaron utilizando el inóculo de cada oveja por separado, para obtener cuatro réplicas por tratamiento. Se utilizaron viales de vidrio (60 mL) en los que se pesaron 200 mg de materia seca de cada una de las muestras. El contenido ruminal extraído de cada animal se filtró a través de cuatro capas de gasa y se trasladó inmediatamente al laboratorio. El fluido ruminal se mezcló con un medio de cultivo descrito por Goering y Van Soest (1970) en una relación 1:4 (vol./vol.) a 39°C bajo gaseado continuo con CO<sub>2</sub>, dosificándose 20 mL de la mezcla en cada vial mediante una bomba peristáltica (Watson-Marlow 520UIP31). Los viales se cerraron herméticamente y se incubaron a 39°C durante 120 horas. Adicionalmente se incluyeron viales sin sustrato (dos por inóculo) para

corregir los valores de producción de gas de sustratos endógenos. La producción de gas se midió en cada vial a las 3, 6, 9, 12, 14, 22, 26, 30, 34, 48, 58, 72, 96 y 120 horas (figura 23), utilizando un transductor de presión (Delta Ohm DTP704-2BGI; Herter Instruments SL, Barcelona, España) el gas producido fue liberado después de cada medición. Los datos de producción de gas medidos en cada vial a cada tiempo de muestreo se ajustaron al modelo:  $\text{mL gas} = PG(1 + (B/t)^c) - 1$  descrita por Groot et al. (1996), donde PG: producción total de gas; B: asíntota de gas y c: velocidad de producción de gas.



**Fig. 23.** Medición de la producción de gas *in vitro*

Por otra parte, en los viales incubados a las 24 h se midió el gas producido y se tomó una muestra (10 mL) en un tubo de vacío (Terumo Europe N.V., Lovaina, Bélgica) para el análisis de metano. Las botellas fueron destapadas y el pH fue medido inmediatamente con un medidor de pH (Crison Basic 20; Crison Instruments, Barcelona, España).

Para el análisis de AGV se tomó a este mismo tiempo, tres mililitros del contenido de los viales y se añadió 3 mL de solución desproteinizadora (20 g de ácido metafosfórico y 0,6 g de ácido crotónico por litro) y para determinar  $\text{NH}_3\text{-N}$  se utilizó 2 mL de contenido más 2 mL de  $\text{HCl } 0.5 \text{ mol L}^{-1}$ .

La digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca (DIVMS) fue medida utilizando un equipo DAYSII (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, EE. UU) con muestras que fueron incubadas hasta las 120 horas.

Las concentraciones de  $\text{N-NH}_3$  se determinaron usando un espectrofotómetro de micro placas Epoch (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) por el método de fenol-hipoclorito (Weatherburn 1967). La producción de ácidos grasos volátiles (AGV) se

determinaron mediante cromatografía de gases como lo describen Carro et al. (1992). El análisis de metano se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Martínez et al. (2010), utilizando un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC 14B; Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Alemania) equipado con un detector de ionización de llama y una columna cargada con Carboxen 1000 (Supelco, Madrid, España).

#### Cálculos y análisis estadísticos

Los datos de producción de gas se ajustaron al modelo exponencial:  $\text{gas} = A \{1 - \exp[-c(t - \text{lag})]\}$ , donde  $A$  es la asíntota de producción de gas,  $c$  es la tasa fraccional de producción de gas,  $\text{lag}$  es el retraso inicial en el inicio de la producción de gas y  $t$  es el tiempo de medición del gas. Los parámetros  $A$ ,  $c$  y  $\text{lag}$  fueron estimados por un procedimiento iterativo de mínimos cuadrados usando un proceso NLIN de SAS (versión 9.2, SAS Institute, Cary, NC, EE. UU) como lo describe Molina-Alcaide et al. (2017). El tiempo medio de producción de gas ( $T_{1/2}$ ) fue el tiempo (h) cuando la mitad del volumen de gas asíntótico ( $A$ ; mL) se produjo y se calculó como  $T_{1/2} = [(\ln 2 / c) + \text{lag}]$ . La tasa promedio de producción de gas (AGPR; mL gas h<sup>-1</sup>) se definió como el promedio de la tasa de producción de gas entre el inicio de la incubación y  $T_{1/2}$ , y fue calculado como  $\text{AGPR} = A c / [2(\ln 2 + c \times \text{lag})]$ . Finalmente, la degradabilidad efectiva de la materia seca (DEMS) se estimó asumiendo una tasa de pasaje ( $Kp$ ) de 0.04 por h de acuerdo con la ecuación:  $\text{DEMS} = [(\text{DIVMS}_{120} \times c) / (c + Kp)] e^{(-c \times \text{lag})}$ .

Los resultados obtenidos fueron analizados bajo un diseño completo al azar (DCA) mediante el paquete estadístico SAS (versión 9.2, SAS Institute, Cary, NC, EE. UU). Las curvas de producción de gas *in vitro* se obtuvieron mediante el programa Prism 4, Graphpad Software, Inc. De San Diego, CA, USA. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey al 5%. La relación entre el contenido de compuestos secundarios y los parámetros de producción de gas y metano fueron evaluados mediante un análisis de correlación simple usando el procedimiento PROC CORR del paquete estadístico SAS (versión 9.2, SAS Institute, Cary, NC, USA).

#### 4.3. Metodología objetivo 3.

##### Ubicación del ensayo

Se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. El clima en la región es frío templado, con una temperatura promedio de 14 ° C y una altitud de 2800 m

##### Tratamientos.

Se recolectaron hojas frescas de *Acacia melanoxylon* para su deshidratación y reducción de partícula. Una vez obtenida la harina de *Acacia melanoxylon* se elaboró tres dietas experimentales *iso-energéticas* e *iso-protéicas* con diferentes contenidos de *Acacia melanoxylon*. Las dietas se elaboraron con base a requerimientos de proteína

metabolizable (PM) y energía metabolizable (EM) según el AFRC (1993). El aporte de PM de las dietas fue de T0:100.35 g/kg MS; T1: 100.82 g/kg MS; y T2: 101.39g/kg MS. El aporte de EM fue de T0:11.78 MJ /kg MS.; T1: 11.67 MJ /kg MS; y T2: 11.74 MJ /kg MS.

#### Animales experimentales

Se utilizó 18 ovinos cruza Dorset x Rambouillet con un peso inicial promedio de 18 kg que se alojaron en corrales individuales en el suelo con comederos y bebederos individuales, el alimento ofrecido fue controlado diariamente. El acceso al agua fue a voluntad. Antes del experimento, todos los animales fueron desparasitados con Ivermectina (Laboratorios Life, Quito-Ecuador, 1%; 1 ml por cada 50 kg de peso vivo) y se inyectaron con vitaminas ADE intramuscularmente (Laboratorios Life, Quito-Ecuador, 1 ml por cada 10 kg de peso vivo).

#### Diseño experimental y tratamientos.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. El experimento se dividió en dos fases, la primera fase de 60 días de duración para la evaluación de consumo voluntario y comportamiento productivo. Y una segunda fase de 7 días para la evaluación de digestibilidad aparente de nutrientes.

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza utilizando un modelo lineal general de SAS. Las medias fueron comparadas por la prueba de Tukey. El análisis de todos los datos se realizó utilizando el paquete estadístico SAS (2002).

#### Variables Respuesta:

Consumo voluntario de materia seca y ganancia de peso.

Los animales se alojaron en jaulas a nivel del suelo para medir individualmente el consumo voluntario de alimento. El consumo se estimó como la diferencia entre la cantidad de alimento ofrecido y el alimento restante después de 24 h, durante tres días consecutivos cada 15 días. Este procedimiento se realizó durante un período total de 60 días, y se obtuvieron muestras de alimento ofrecido y rechazado para su análisis proximal en laboratorio.

Los registros de peso se realizaron al mismo tiempo de la determinación del consumo voluntario utilizando una balanza electrónica marca Accurex modelo RX-150-S®

#### Digestibilidad aparente

Los animales se ubicaron en jaulas metabólicas individuales por 4 días que correspondieron a un periodo de adaptación para realizar pruebas de digestibilidad aparente de nutrientes. El periodo de colección de heces se realizó los posteriores cinco días. Para cada uno de los tratamientos se utilizó el método directo de colección total de



heces. La producción de heces total por animal fue registrada y se tomó una muestra de 100 g que fue llevado a la estufa a 60°C por 72 horas (o hasta que alcanzaron un peso constante) para la determinación de materia seca. Todas las muestras de heces secas fueron molidas y tamizadas (1 mm) y etiquetadas para el análisis posterior de composición química proximal. Con base a los resultados obtenidos del análisis proximal de heces y forraje, se determinó el porcentaje de digestibilidad aparente de los nutrientes aplicando el método directo de digestibilidad descrito por Schneider and Flatt (1975).

#### Producción de orina y derivados de purina.

La producción diaria total de orina se recogió cada 24 h durante 5 días en un recipiente de plástico que contenía ácido sulfúrico al 10% para mantener el pH < 3, evitando así la volatilización del nitrógeno. Del volumen diario total, se obtuvo una muestra de 120 ml y se congeló a aproximadamente 4 ° C hasta el análisis químico. Las muestras de orina se analizaron para determinar N-ureico, ácido úrico, alantoína, xantina y xantina + hipoxantina (Piñeiro-Vázquez et al., 2015).

La alantoína fue determinada por espectrofotometría por los procedimientos descritos por Chen & Gomes, (1992). La determinación del ácido úrico se llevó a cabo con la técnica propuesta por Fujihara et al, (1987). La síntesis de proteínas microbianas se estimó con la metodología propuesta por Chen & Gomes, (1992).

#### Producción de metano

Los moles totales de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> producidos se estimaron según la técnica de Wolin, (1960). El mol de hexosa fermentada en el rumen se calculó a partir del consumo de carbohidratos digestibles y el peso molecular de la hexosa (162). Para cada dieta, el consumo de carbohidratos digestibles (CCD) se estimó a partir del consumo de materia orgánica digestible (CMOD) y la digestibilidad de la materia orgánica *in situ* a las 24 h (DMO24h) como:  $CCD = CMOD \times DMO24h$ .

#### Ácidos grasos volátiles

Para la determinación de ácidos grasos volátiles, al final del periodo experimental se tomaron directamente del rumen a través de una sonda gástrica 40 ml de líquido ruminal de cada animal. Las muestras se filtraron usando un paño para queso, se tomó una submuestra de 4 ml y se mezcló con 1 ml ácido metafosfórico al 25% y se mantuvo a 4° C para el posterior análisis de ácidos grasos volátiles (AGV).

## ***CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

## 5.1. INFLUENCIA POTENCIAL DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS TROPICALES SOBRE LAS ACTIVIDADES DE FERMENTACIÓN RUMINAL Y MITIGACIÓN DEL METANO

### 5.1.1. INTRODUCCIÓN

El metano ( $\text{CH}_4$ ), el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) tienen la capacidad de elevar la temperatura de la tierra al absorber la radiación de onda larga y son identificados como gases de efecto invernadero. El  $\text{CH}_4$  es el gas de efecto invernadero más importante para el calentamiento global, después de las emisiones de  $\text{CO}_2$ . El 70% de la producción de metano es de origen antropogénico, de los cuales la agricultura representa el 66% de esta producción y de este último valor, el metano producido por la ganadería representa entre el 22 y el 39% (Moss et al., 2000; Gerber et al., 2013). La producción de metano a partir de la fermentación entérica depende de las especies animales involucradas. Ku-Vera et al. (2018), informaron valores diarios de producción de metano en vaquillas *B. taurus* x *B. indicus* de 88.08 g / novilla / día (18.9 min -150.1 máx.). En ovejas, Sejian et al. (2011), reportaron una producción de metano de 13.7 g / oveja / día. Las emisiones de metano representan pérdidas de hasta el 15% de la energía bruta consumida por ingestión en ganado alimentados con forrajes (Johnson & Johnson 1995). Por lo tanto, es deseable desarrollar estrategias de alimentación más eficientes para el animal, que mitiguen la emisión de  $\text{CH}_4$  entérico, para reducir los efectos nocivos producidos en la atmósfera por estos gases y maximizar el uso de energía por parte del animal.

Las estrategias utilizadas para reducir la emisión de  $\text{CH}_4$  es el uso de compuestos bioactivos de las plantas, como los taninos condensados (CT) que están presentes en ciertas leguminosas arbustivas con potencial forrajero (Carulla et al., 2005; Puchala et al., 2005). En este sentido, Carulla et al. (2005), mostraron que la inclusión de 29 g / kg de MS de taninos condensados presentes en *Acacia mearnsi* redujo la emisión de  $\text{CH}_4$  en 130 kJ / MJ en ovejas alimentadas con una mezcla de *Lolium Perenne* y *Trifolium pratense*. Del mismo modo, Hess et al. (2003), informaron que la emisión *in vitro* de  $\text{CH}_4$  disminuyó a la mitad cuando un tercio de la dieta herbácea fue reemplazada por la leguminosa tropical *Calliandra calothyrsus* con un contenido de tanino condensado de 270 g / kg de MS.

Sin embargo, cada ubicación geográfica tiene diferentes variedades de leguminosas forrajeras, cada una con diferentes contenidos de metabolitos secundarios y dependientes de las condiciones ambientales de cada región. Además, la acción antimicrobiana y los efectos sobre la fermentación ruminal de estos compuestos dependen de su naturaleza, actividad y concentración en la planta o producto vegetal (Gunjan & Makkar 2012). Estos compuestos secundarios presentes en estas plantas pueden proteger las proteínas de la degradación y mejorar la eficiencia del uso de nitrógeno en los rumiantes al aumentar la cantidad de proteínas en las partes inferiores del tracto gastrointestinal (Torres et al.,

2008) pero también pueden reducir la degradación de la fibra ruminal al disminuir la colonización de microbios en las partículas de alimentos (Makkar, 2003). Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar la influencia de las especies forrajeras adaptadas a la región tropical del Ecuador en la producción de gas, metano entérico, digestión y fermentación ruminal.

### 5.1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### Animales y alimentación

Cuatro ovejas Rambouillet con un peso vivo de 66.6 kg de peso vivo ( $\pm 0.75$  kg) de 4 años de edad provistas de una cánula permanente en el rumen se utilizaron como donantes de contenido ruminal para las incubaciones *in vitro*. Los animales estaban bajo el cuidado de personal capacitado, de acuerdo con las directrices españolas para la protección de los animales de acuerdo con la normativa europea. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética y Experimentación Animal de la Comunidad Autónoma de Madrid (número de autorización PROEX 035/17).

Los animales fueron alimentados con una dieta mixta que consistía en 600 g de heno de avena y 400 g de un concentrado comercial por kg (en base de materia fresca). El concentrado consistió en (g / kg, en base de materia fresca) 329 g de grano de cebada, 328 g de grano de maíz, 244 granos de trigo, 62 g de harina de soja, 28 g de  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , 6 g de sal y 2 g de mezcla de vitaminas y minerales. La dieta mixta contenía 112, 350 y 166 g de proteína cruda (PC), fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD) por kg de MS, respectivamente. La cantidad suministrada de alimento fue de 50 g de MS / kg de peso metabólico ( $\text{PV}^{0.75}$ ), ofrecido en dos raciones diarias (09: 00h y 17: 00h). El consumo de agua fue *ad libitum*.

#### Recolección de muestras

Las leguminosas arbóreas utilizadas para el estudio pertenecen a un clima tropical de Ecuador ubicado entre 700 y 800 metros sobre el nivel del mar. Las especies estudiadas fueron *Clitoria arborea*, *Erytrina fusca*, *Bauhinia forficata*, *Erytrina poeppigiana*, *Cratylia argentea*, *Glirycidia sepium*, *Cassia tora* y *Flemingia macrophylla*. Se recolectaron muestras de aproximadamente 500 g de hojas verdes de cada especie. El muestreo se realizó durante los meses de enero y febrero correspondientes a la temporada de lluvias. La humedad relativa del sector es del 75% al 80% y la precipitación media anual es de aproximadamente 3164 mm. Todas las hojas se secaron en una estufa a 60 ° C durante 72 h, y las muestras se molieron usando un molino de martillos con un tamiz de 1 mm. Finalmente, las muestras se almacenaron para su posterior análisis químico y pruebas *in vitro*. La composición química de los forrajes se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición química de diferentes leguminosas de clima tropical expresadas en g / kg<sup>-1</sup> de materia seca (excepto cuando se indique lo contrario)

|                     | <i>C.<br/>arborea</i> | <i>E.<br/>fusca</i> | <i>B.<br/>forficata</i> | <i>E.<br/>poeppigiana</i> | <i>C.<br/>argentea</i> | <i>G.<br/>sepium</i> | <i>C.<br/>torta</i> | <i>F.<br/>macrophylla</i> |
|---------------------|-----------------------|---------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------|---------------------|---------------------------|
| MS                  | 270.0                 | 191.9               | 312.4                   | 187.2                     | 264.8                  | 211.0                | 229.4               | 164.2                     |
| MO                  | 944.5                 | 939.0               | 940.7                   | 907.6                     | 885.1                  | 941.6                | 923.5               | 942.8                     |
| PC                  | 227.1                 | 214.9               | 185.8                   | 202.4                     | 240.2                  | 250.1                | 219.2               | 193.4                     |
| PC-FAD (%)          | 28.7                  | 9.0                 | 45.2                    | 16.4                      | 10.8                   | 7.2                  | 32.0                | 45.6                      |
| FND                 | 675.2                 | 585.0               | 631.0                   | 609.8                     | 564.7                  | 430.6                | 487.1               | 652.4                     |
| FAD                 | 550.8                 | 334.7               | 491.1                   | 373.0                     | 323.5                  | 261.8                | 350.7               | 514.9                     |
| LAD                 | 300.3                 | 116.1               | 304.9                   | 160.4                     | 138.4                  | 139.8                | 193.3               | 293.0                     |
| LAD/FAD (%)         | 54.5                  | 34.6                | 62.0                    | 43.0                      | 42.7                   | 53.4                 | 55.1                | 56.9                      |
| FT <sup>2</sup> (%) | 1.9                   | 0.8                 | 0.9                     | 0.6                       | 0.4                    | 1.7                  | 2.3                 | 1.7                       |
| TC <sup>3</sup> (%) | 1.3                   | 0.4                 | 0.4                     | 0.4                       | 0.2                    | 0.3                  | 1.7                 | 0.7                       |

MS: materia seca; MO: materia orgánica; PC: proteína cruda; PC-FAD: proteína cruda ligada a la fibra detergente ácida; FND: fibra neutra detergente libre de cenizas; FAD: fibra ácida detergente libre de cenizas; LAD: lignina detergente libre de cenizas sin ácido; ADL / ADF: lignina en relación con la fibra ácida detergente; <sup>2</sup>FT: fenoles totales usando ácido tánico como estándar; <sup>3</sup>TC: taninos condensados utilizando catequina como estándar.

### Incubaciones *in vitro*

Para las incubaciones *in vitro* se obtuvo líquido ruminal de cuatro ovejas inmediatamente antes de alimentarlas por la mañana. Las incubaciones se realizaron utilizando el inóculo de cada oveja por separado, para obtener cuatro réplicas por tratamiento. Se usaron viales de vidrio (60 ml), en los que se pesaron 200 mg de materia seca de las muestras. El contenido ruminal extraído de cada animal se filtró a través de cuatro capas de gasa y se transfirió inmediatamente al laboratorio. El fluido ruminal se mezcló con un medio de cultivo descrito por Goering & Van Soest (1970) en una proporción de 1: 4 (vol / vol) a 39 ° C bajo gaseo continuo con CO<sub>2</sub>. Se dosificaron veinte ml de la mezcla en cada vial, usando una bomba peristáltica (Watson-Marlow 520UIP31). Los viales se sellaron herméticamente y se incubaron a 39 ° C durante 120 horas. Además, se incluyeron viales sin sustrato (dos por inóculo) para corregir los valores de producción de gas por la fermentación de sustratos endógenos. La producción de gas se midió en cada vial a las 3, 6, 9, 12, 14, 22, 26, 30, 34, 48, 58, 72, 96 y 120 horas utilizando un transductor de presión (Delta Ohm DTP704-2BGI Herter Instruments SL, Barcelona, España), y el gas producido fue liberado después de cada medición.

En los viales incubados durante 24 h, se midió el gas producido y se tomó una muestra (10 ml) en un tubo de vacío (Terumo Europe N.V., Lovaina, Bélgica) para el análisis de metano. Las botellas se destaparon y el pH se midió inmediatamente con un medidor de pH (Crison Basic 20, Crison Instruments, Barcelona, España). Para el análisis de ácidos grasos volátiles (AGV), se tomaron tres mililitros del contenido de los viales y se mezclaron con 3 ml de solución desproteinizante (20 g de ácido metafosfórico y 0,6 g de ácido crotónico por litro). Además, para el análisis de  $\text{NH}_3\text{-N}$ , se mezclaron 2 ml de contenido de viales con 2 ml de  $\text{HCl}$  0.5  $\text{M}^{-1}$ . La digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca (DIVMS) se midió utilizando una incubadora DAYSII II (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, EE. UU.). Las muestras se incubaron durante 120 horas.

### **Análisis químico**

El contenido de materia seca (ID 934.01), cenizas (ID 942.05) y nitrógeno (ID 990.03) se analizaron de acuerdo con el AOAC (1999). La fibra neutro detergente (FND) y la fibra ácida detergente (FAD) se midieron secuencialmente usando la misma muestra en bolsas de filtro y se expresaron sin incluir cenizas residuales de acuerdo con Van Soest et al. (1991), utilizando un analizador de fibra ANKOM220 (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, EE. UU.). La lignina ácida detergente (LAD) se determinó por solubilización de celulosa con ácido sulfúrico (72%) de acuerdo con Van Soest et al. (1991). Los fenoles totales (FT) se determinaron con el método Folin-Ciocalteu de acuerdo con Makkar (2003) utilizando el ácido tánico como estándar y los taninos condensados (TC) se midieron por el método del ácido clorhídrico de vainillina (Broadhurst y Jones, 1978), utilizando catequina como estándar, utilizando un espectrofotómetro UV VIS U2000 de Hitachi.

Las concentraciones de  $\text{NH}_3\text{-N}$  se determinaron usando un espectrofotómetro de micro placa Epoch (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EE. UU.) Por el método del fenol-hipoclorito (Weatherburn, 1967). La disponibilidad neta de  $\text{H}_2$  se estimó utilizando los parámetros resultantes de la producción de AGV: 2 (acetato + butirato + isobutirato) - (propionato + isovalerato + valerato) (Wang et al., 2014). La concentración de AGV se determinó por cromatografía de gases como lo describen Carro et al. (1992). El análisis de metano se realizó siguiendo el procedimiento de Martínez et al. (2010), utilizando un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC 14B; Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Alemania) equipado con un detector de ionización de llama y una columna cargada con Carboxen 1000 (Supelco, Madrid, España).

### **Cálculos y análisis estadístico**

Para estimar los parámetros cinéticos de la fermentación, los datos de producción de gas se ajustaron al modelo exponencial de acuerdo con Krishnamoorthy et al. (1991) que menciona que producción de gas =  $A \{1 - \exp [-c (t - \text{lag})]\}$ , donde A: es la asíntota de la producción de gas, c: es la tasa de producción fraccional de gas, lag: es el retraso inicial

al comienzo de la producción de gas y  $t$ : es el tiempo de medición del gas. Los parámetros  $A$ ,  $c$  y  $\text{lag}$  se estimaron mediante un procedimiento iterativo de mínimos cuadrados utilizando un proceso SAS NLIN (versión 9.2, SAS Institute, Cary, NC, EE. UU.) según lo descrito por Molina-Alcaide et al. (2017). El tiempo medio de producción de gas ( $T^{1/2}$ ) fue el tiempo (h) cuando se produjo la mitad del volumen de gas asintótico ( $A$ , ml) y se calculó como  $T^{1/2} = [(\ln^2 / c) + \text{lag}]$ . La tasa promedio de producción de gas (TPPG; mL de gas  $\text{h}^{-1}$ ) se definió como la media de la tasa de producción de gas entre el inicio de la incubación y  $T^{1/2}$ , y se calculó como  $\text{TPPG} = A c / [2 (\ln^2 + c \times \text{lag})]$ . Finalmente, la degradabilidad efectiva de la materia seca (DEMS) se estimó suponiendo una velocidad de paso ( $K_p$ ) de 0.04 por h de acuerdo con la ecuación:  $\text{DEMS} = [(DIVMS_{120 \text{ h}} \times c) / (c + K_p)] e^{-c \times \text{lag}}$ .

Los resultados obtenidos se analizaron bajo un diseño aleatorio completo, utilizando el paquete estadístico SAS (versión 9.2, SAS Institute, Cary, NC, EE. UU.). Las curvas de producción de gas *in vitro* se obtuvieron a través del programa Prism 4, Graphpad Software, Inc. de San Diego, CA, EE. UU. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey. La relación entre el contenido de compuestos secundarios y los parámetros de producción de gas y metano se evaluaron mediante un análisis de correlación simple utilizando el procedimiento PROC CORR del paquete estadístico SAS (versión 9.2, SAS Institute, Cary, NC, EE. UU.).

### 5.1.3. RESULTADOS

#### Parámetros de producción de gas y metano

La cinética de producción de gas mostró un comportamiento distinto según las especies forrajeras evaluadas (Tabla 4). La asíntota más baja ( $P = 0.0001$ ) de la producción de gas ( $A$ ) fue para el forraje *C. arborea* con una diferencia de 121.8 mL / g MS con respecto al forraje *G. sepium* 163.4 mL / g MS) que produjo más gas ( $A$ ). La tasa fraccional más alta ( $P = 0.0001$ ) de producción de gas ( $c$ ) se observó en *E. fusca* (0.052 / h). Con respecto al tiempo transcurrido para el inicio de la producción de gas ( $\text{lag}$ ) no se observaron diferencias entre los forrajes evaluados ( $P = 0.8426$ ). La tasa media más baja de producción de gas (TPPG) y gas / mL g / 24h ( $P = 0.0001$ ) se observó en los forrajes *C. arborea* y *B. forficata* (1.01 a 1.22 TPPG mL / h y 47 a 47.5 mL g / 24 h respectivamente). Con respecto a la menor producción de  $\text{CH}_4$  mL g / 24h y %  $\text{CH}_4$  total / 24h fue para los forrajes *C. arborea*, *E. fusca*, *B. forficata*, *C. tora*, *F. macrophylla* con  $\text{CH}_4$  varía de 1.23 a 1.84 mL g / 24h y 2.59 a 3.87 % de gas total  $\text{CH}_4$  / 24 h respectivamente ( $P < 0.05$ ).

Tabla 4. Parámetros de cinética de producción de gas *in vitro* y degradabilidad efectiva de la materia seca (DEMS) de leguminosas de árboles de clima tropical

|                       | Parámetros de producción de gas |                     |        |                    |                    | Producción CH <sub>4</sub> |                                    | Digestibilidad ruminal     |                             |                    |                       |
|-----------------------|---------------------------------|---------------------|--------|--------------------|--------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------|
|                       | A                               | c                   | lag    | TPPG<br>mL/h       | Gas<br>mLg/24h     | CH <sub>4</sub><br>mLg/24h | % CH <sub>4</sub> gas<br>total/24h | DEMS <sub>4%</sub><br>g/kg | DVMS <sub>120</sub><br>mg/g | MOF<br>mg/g        | MOF<br>% <sup>2</sup> |
| <i>C. arborea</i>     | 41.6 <sup>f</sup>               | 0.044 <sup>ab</sup> | 1.6    | 1.22 <sup>d</sup>  | 47.0 <sup>c</sup>  | 1.23 <sup>c</sup>          | 2.59 <sup>c</sup>                  | 404.6 <sup>a</sup>         | 82.5 <sup>a</sup>           | 43.4 <sup>b</sup>  | 22.9 <sup>b</sup>     |
| <i>E. fusca</i>       | 100.9 <sup>c</sup>              | 0.052 <sup>a</sup>  | 1.7    | 3.21 <sup>b</sup>  | 52.0 <sup>b</sup>  | 1.80 <sup>c</sup>          | 3.46 <sup>c</sup>                  | 333.8 <sup>ab</sup>        | 66.5 <sup>ab</sup>          | 58.1 <sup>ab</sup> | 30.8 <sup>ab</sup>    |
| <i>B. forficata</i>   | 55.4 <sup>ef</sup>              | 0.027 <sup>b</sup>  | 0.8    | 1.01 <sup>d</sup>  | 47.5 <sup>c</sup>  | 1.84 <sup>c</sup>          | 3.87 <sup>c</sup>                  | 310.7 <sup>ab</sup>        | 81.4 <sup>a</sup>           | 44.2 <sup>b</sup>  | 23.4 <sup>b</sup>     |
| <i>E. poeppigiana</i> | 84.8 <sup>d</sup>               | 0.027 <sup>b</sup>  | 1.0    | 1.55 <sup>cd</sup> | 50.1 <sup>bc</sup> | 2.21 <sup>bc</sup>         | 4.40 <sup>bc</sup>                 | 276.5 <sup>b</sup>         | 71.9 <sup>ab</sup>          | 55.4 <sup>ab</sup> | 30.4 <sup>ab</sup>    |
| <i>C. argentea</i>    | 118.8 <sup>b</sup>              | 0.027 <sup>b</sup>  | 2.6    | 2.06 <sup>c</sup>  | 51.7 <sup>b</sup>  | 3.03 <sup>b</sup>          | 5.82 <sup>b</sup>                  | 247.7 <sup>b</sup>         | 67.5 <sup>ab</sup>          | 60.3 <sup>ab</sup> | 34.0 <sup>ab</sup>    |
| <i>G. sepium</i>      | 163.4 <sup>a</sup>              | 0.045 <sup>ab</sup> | 2.3    | 4.67 <sup>a</sup>  | 58.2 <sup>a</sup>  | 4.68 <sup>a</sup>          | 8.03 <sup>a</sup>                  | 254.4 <sup>b</sup>         | 53.1 <sup>b</sup>           | 83.7 <sup>a</sup>  | 44.3 <sup>a</sup>     |
| <i>C. tora</i>        | 66.4 <sup>e</sup>               | 0.037 <sup>ab</sup> | 1.1    | 1.66 <sup>cd</sup> | 48.4 <sup>bc</sup> | 1.73 <sup>c</sup>          | 3.57 <sup>c</sup>                  | 333.6 <sup>ab</sup>        | 73.4 <sup>ab</sup>          | 49.3 <sup>b</sup>  | 26.6 <sup>b</sup>     |
| <i>F. macrophylla</i> | 53.2 <sup>ef</sup>              | 0.040 <sup>ab</sup> | 1.0    | 1.45 <sup>cd</sup> | 48.3 <sup>bc</sup> | 1.62 <sup>c</sup>          | 3.34 <sup>c</sup>                  | 348.2 <sup>ab</sup>        | 73.9 <sup>ab</sup>          | 49.3 <sup>b</sup>  | 26.1 <sup>b</sup>     |
| EEM                   | 33.80                           | 0.0049              | 0.92   | 0.141              | 0.80               | 0.234                      | 0.402                              | 25.57                      | 47.41                       | 6.25               | 3.35                  |
| P- valor              | 0.0001                          | 0.0001              | 0.8426 | 0.0001             | 0.0001             | 0.0001                     | 0.0001                             | 0.0001                     | 0.0001                      | 0.0001             | 0.0001                |

<sup>abcdef</sup> Los valores seguidos de letras distintas entre columnas difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). A: asíntota de producción de gas (mL / g<sup>-1</sup>MS); c: tasa de producción fraccional de gas (h<sup>-1</sup>); lag: tiempo transcurrido para el inicio de la producción de gas; TPPG: tasa promedio de producción de gas; DEMS: degradabilidad efectiva de la materia seca para una tasa de paso de partículas en el rumen del 4% h<sup>-1</sup>; DVMS: digestibilidad verdadera de MS después de 120 h de incubación. MOF: Materia orgánica fermentable; <sup>2</sup> Los valores de fermentación de la materia orgánica se estimaron a partir de la producción de ácidos grasos volátiles según Demeyer (1991).



### Degradación y fermentación ruminal

La degradación ruminal efectiva de la MS (DEMS<sub>4%</sub>) fue mayor ( $P = 0,0001$ ) en *C. arborea* (404,6 g / kg de MS). La digestibilidad más alta ( $P = 0.0001$ ) (DIVMS<sub>120</sub>) se observó en los forrajes *C. arborea* y *B. forficata* (82.5 y 81.4 mg / g MS respectivamente). La fermentación más alta ( $P = 0.0001$ ) de MO (MOF y % MOF) se observó en *G. sepium* (83.7 mg / g y 44.3% respectivamente) (Tabla 4).

Las especies forrajeras evaluadas no afectaron significativamente la concentración de NH<sub>3</sub>-N en el rumen ( $P = 0.1291$ ). Sin embargo, la producción de H<sub>2</sub> en el rumen mostró un efecto ( $P = 0.0001$ ) entre los forrajes, produciendo H<sub>2</sub> más alto *G. sepium* (31.2 H<sub>2</sub> neto). El pH más alto ( $P = 0.0001$ ) se observó en forrajes *C. arborea*, *B. forficata*, *E. poeppigiana*, *C. argentea*, *C. tora*, *F. macrophylla*. La concentración de AGV total en el rumen fue mayor ( $P = 0.0001$ ) cuando se incubó *G. sepium* (25.3 mmol / L). Sin embargo, cuando se estimó el CH<sub>4</sub> producido en relación con el patrón de fermentación (AGV), se produjo una disminución significativa ( $P = 0.0001$ ) del CH<sub>4</sub> producido por los forrajes *C. arborea*, *E. fusca*, *F. macrophylla* (2.42, 2.58 y 2.79 mL / mmol, respectivamente) en comparación con las otras especies forrajeras evaluadas (Tabla 5).

Con respecto a la proporción molar de AGV, se observaron diferencias en todos los forrajes evaluados, obteniendo una mayor proporción ( $P < 0.05$ ) de acetato (Ac): *C. arborea* (72.5 mol / 100mol), propionato (Pr): *E. fusca* y *G. sepium* (22.2 y 23.0 mol / 100mol respectivamente), butirato: *C. arborea*, *E. poeppigiana* y *F. macrophylla* (7.2, 7.4 y 7.0 mol / 100mol respectivamente), isobutirato: *E. poeppigiana* (1.2 mol / 100mol), Isovalerato: *C. arborea*, *B. forficata*, *E. poeppigiana*, *C. argentea*, *G. sepium*, *C. tora*, *F. macrophylla* (1.48, 1.54, 1.74, 1.90, 1.48, 1.55 y 1.39 mol / 100mol respectivamente), valerato : *E. poeppigiana*, *C. argentea*, *G. sepium* (1.07, 1.14 y 1.06 mol / 100mol respectivamente), isoácidos: *C. arborea*, *B. forficata*, *E. poeppigiana*, *C. argentea*, *G. sepium*, *C. tora* ( 2.58, 2.62, 3.03, 3.25, 2.65 y 2.73 mol / 100mol respectivamente). Sin embargo, la relación: acetato / propianato fue menor ( $P = 0.0001$ ) en *G. sepium* (2.92) en comparación con los otros forrajes evaluados (Tabla 5). La Tabla 6 muestra que existe una correlación ( $P < 0.05$ ) entre la mitigación de la producción de gas y metano con algunos componentes nutricionales de forrajes evaluados como PC, FAD y LAD y productos de fermentación ruminal como AGV total, Ac, Pr, H<sub>2</sub> neto y DEMS<sub>4%</sub>.

Tabla 5. Producción de gas y metano entérico (CH<sub>4</sub>), hidrógeno neto (H<sub>2</sub>), relación molar de ácidos grasos volátiles de leguminosas forrajeras de clima tropical

|  | <i>C. arborea</i>  | <i>E. fusca</i>      | <i>B. forficata</i> | <i>E. poeppigiana</i> | <i>C. argentea</i>  | <i>G. sepium</i>   | <i>C. tora</i>       | <i>F. macrophylla</i> | EEM   | P     |
|--|--------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|-------|-------|
| NH <sub>3</sub> -N (mg/L <sup>-1</sup> ) | 148.25             | 109.45               | 161.70              | 179.23                | 206.39              | 220.35             | 142.83               | 139.52                | 27.40 | 0.129 |
| H <sub>2</sub> net <sup>1</sup>          | 18.37 <sup>b</sup> | 22.47 <sup>ab</sup>  | 18.37 <sup>b</sup>  | 22.28 <sup>ab</sup>   | 23.82 <sup>ab</sup> | 31.20 <sup>a</sup> | 19.74 <sup>b</sup>   | 20.12 <sup>ab</sup>   | 2.43  | <.001 |
| pH                                       | 7.30 <sup>a</sup>  | 7.12 <sup>ab</sup>   | 7.27 <sup>a</sup>   | 7.18 <sup>a</sup>     | 7.15 <sup>a</sup>   | 6.93 <sup>b</sup>  | 7.23 <sup>a</sup>    | 7.24 <sup>a</sup>     | 0.04  | <.001 |
| Total AGV (mmol/L)                       | 12.96 <sup>b</sup> | 17.47 <sup>ab</sup>  | 13.25 <sup>b</sup>  | 16.59 <sup>ab</sup>   | 18.22 <sup>ab</sup> | 25.32 <sup>a</sup> | 14.64 <sup>b</sup>   | 14.55 <sup>b</sup>    | 1.92  | <.001 |
| CH <sub>4</sub> /AGV (mL/mmol)           | 2.42 <sup>c</sup>  | 2.58 <sup>c</sup>    | 3.57 <sup>abc</sup> | 3.38 <sup>abc</sup>   | 4.17 <sup>ab</sup>  | 4.63 <sup>a</sup>  | 3.01 <sup>bc</sup>   | 2.79 <sup>c</sup>     | 0.27  | <.001 |
| Proporción molar (mol/100mol)            |                    |                      |                     |                       |                     |                    |                      |                       |       |       |
| Acetato (Ac)                             | 72.52 <sup>a</sup> | 70.97 <sup>abc</sup> | 72.17 <sup>ab</sup> | 69.47 <sup>bcd</sup>  | 68.95 <sup>cd</sup> | 67.40 <sup>d</sup> | 70.70 <sup>abc</sup> | 71.67 <sup>abc</sup>  | 0.61  | <.001 |
| Propionato (Pr)                          | 16.62 <sup>d</sup> | 22.27 <sup>a</sup>   | 17.69 <sup>dc</sup> | 18.96 <sup>bc</sup>   | 19.91 <sup>b</sup>  | 23.09 <sup>a</sup> | 18.89 <sup>bc</sup>  | 18.06 <sup>bcd</sup>  | 0.44  | <.001 |
| Butirato                                 | 7.29 <sup>a</sup>  | 4.72 <sup>c</sup>    | 6.58 <sup>ab</sup>  | 7.44 <sup>a</sup>     | 6.73 <sup>ab</sup>  | 5.77 <sup>bc</sup> | 6.68 <sup>ab</sup>   | 7.00 <sup>a</sup>     | 0.22  | <.001 |
| Isobutirato                              | 1.09 <sup>ab</sup> | 0.55 <sup>b</sup>    | 1.07 <sup>ab</sup>  | 1.28 <sup>a</sup>     | 1.35 <sup>a</sup>   | 1.17 <sup>ab</sup> | 1.18 <sup>ab</sup>   | 0.95 <sup>ab</sup>    | 0.15  | <.001 |
| Isovalerato                              | 1.48 <sup>a</sup>  | 0.71 <sup>b</sup>    | 1.54 <sup>a</sup>   | 1.74 <sup>a</sup>     | 1.90 <sup>a</sup>   | 1.48 <sup>a</sup>  | 1.55 <sup>a</sup>    | 1.39 <sup>a</sup>     | 0.12  | <.001 |
| Valerato                                 | 1.00 <sup>ab</sup> | 0.73 <sup>b</sup>    | 0.90 <sup>ab</sup>  | 1.07 <sup>a</sup>     | 1.14 <sup>a</sup>   | 1.06 <sup>a</sup>  | 0.98 <sup>ab</sup>   | 0.89 <sup>ab</sup>    | 0.06  | <.001 |
| Isoácidos                                | 2.58 <sup>a</sup>  | 1.26 <sup>b</sup>    | 2.62 <sup>a</sup>   | 3.03 <sup>a</sup>     | 3.25 <sup>a</sup>   | 2.65 <sup>a</sup>  | 2.73 <sup>a</sup>    | 2.35 <sup>ab</sup>    | 0.25  | <.001 |
| Ac/Pr                                    | 4.38 <sup>a</sup>  | 3.18 <sup>de</sup>   | 4.10 <sup>ab</sup>  | 3.66 <sup>bcd</sup>   | 3.46 <sup>cde</sup> | 2.92 <sup>e</sup>  | 3.75 <sup>bcd</sup>  | 3.97 <sup>abc</sup>   | 0.12  | <.001 |

<sup>abcde</sup> los valores seguidos de diferentes literales entre columnas difieren significativamente (P < 0.05). <sup>1</sup> Se calculó H<sub>2</sub> neto resultante de la producción de AGV: H<sub>2</sub> Neto = 2 (acetato + butirato + isobutirato) - (propionato + isovalerato + valerato), Wang et al (2014).

### 5.1.4. DISCUSIÓN

#### Parámetros de producción de gas y metano

Los parámetros de producción de gas, así como la producción de CH<sub>4</sub> a las 24 h en todas las leguminosas arbóreas estudiadas, mostraron marcadas diferencias entre ellas, observando una disminución en los parámetros de producción de gas y metano a medida que el contenido de TC aumentó, como fue el caso de *C. arborea*, que tuvo la menor producción de gas y metano con el mayor contenido de tanino, en contraste con *G. sepium*, que presentó una mayor producción de gas y metano con el menor contenido de TC. Sin embargo, el modo de acción de las TC sobre la metanogénesis puede diferir independientemente de las concentraciones (Rira et al., 2015). Dado que en este estudio el contenido de TC podría estar relacionado indirectamente con la disminución de estos gases, como consecuencia de la reducción de la producción de H<sub>2</sub> en el rumen, porque no hubo una correlación significativa ( $r = -0.586$ ) entre TC y la producción de gas y CH<sub>4</sub>. Lo anterior es consistente con lo reportado por Molina-Alcaide et al. (2017). Por otra parte, se observó en este estudio que la mitigación de gas y metano se correlacionó directamente con el contenido de nutrientes, así como con la digestión de la MS, H<sub>2</sub> neta en el rumen, AGV total y AGV proporcional. Estos resultados son consistentes con los reportados por Makkar (2003); Barros-Rodríguez et al. (2015)

#### Degradación y fermentación ruminal

Los resultados obtenidos en la degradación efectiva de la MS y la digestibilidad *in vitro* de la MS posiblemente se debieron a un mejor ambiente ruminal, causado por la degradación de las proteínas que afectan positivamente la formación de ácidos grasos de cadena corta ramificada que benefician el crecimiento de microorganismos celulolíticos en el rumen (Molina-Alcaide et al., 2017), sin embargo, la menor fermentación de MO en forrajes con menor producción de gas y metano (*C. arborea*, *E. fusca*, *B. forficata*, *C. tora*, *F. macrophylla*) estarían relacionados con el contenido, la naturaleza y la acción biogénica de los taninos (Goel & Makkar, 2012; Gameda & Hassen, 2015) que al formar complejos con proteínas y carbohidratos, reducen la digestión y la fermentación de la MO (MOF) en el rumen (Makkar, 2003). Lo anterior es consistente con esta investigación ya que se observa que las especies forrajeras con menor contenido de taninos contienen una mayor fermentación de MO. Lo que explica que en este trabajo la reducción en la producción de gas y metano entérico podría estar relacionada con la menor MOF. Resultados observados en ensayos con animales no adaptados al consumo de forrajes con taninos. Estos resultados son consistentes con los reportados por Rira et al. (2015)

La concentración ruminal de NH<sub>3</sub>-N generalmente tiende a disminuir con la inclusión de taninos condensados en la dieta, sin embargo, en el presente estudio no se observaron cambios significativos en los niveles de NH<sub>3</sub>-N, incluso en especies con mayor contenido de TC (*C. Tora*), resultados consistentes a los reportados por Rira et al. (2015) En el rumen, el H<sub>2</sub> se produce a partir de la fermentación de carbohidratos y aminoácidos

(Wang et al., 2014) y es la principal fuente de energía para el crecimiento de microorganismos responsables en la formación de metano (Janssen, 2010). Lo anterior es consistente con los resultados de esta investigación que muestran una correlación ( $r = 0.956$ ) entre  $H_2$  neto y  $CH_4$  (Tabla 6).

Tabla 6. Coeficientes de correlación ( $r$ ) entre valor nutritivo, AGV,  $H_2$  neto, DEMS y producción de gas y metano entérico de leguminosas de clima tropical

|                    | Producción gas | Producción $CH_4$ |
|--------------------|----------------|-------------------|
|                    | $r$            | $r$               |
| PC                 | 0.713*         | 0.672             |
| FAD                | -0.884**       | -0.743*           |
| LAD                | -0.801**       | -0.570            |
| FT                 | -0.245         | -0.110            |
| TC                 | -0.586         | -0.545            |
| AGV Total          | 0.973***       | 0.950***          |
| Ac                 | -0.929***      | -0.918***         |
| Pr                 | 0.901**        | 0.734*            |
| Bt                 | -0.527         | -0.302            |
| Ac/Pr              | -0.930***      | 0.491*            |
| $H_2$ neto         | 0.965***       | 0.956***          |
| DEMS <sub>4%</sub> | -0.787**       | -0.798**          |

PC: proteína cruda, FAD: fibra ácida detergente, ADL: lignina de detergente ácido, FT: fenoles totales, TC: taninos condensados, AGV total: ácidos grasos volátiles totales, Ac: acetato, Pr: propionato, Bt: butirato, Ac / Pr: relación acetato / propionato,  $H_2$ : hidrógeno neto, DEMS: degradabilidad efectiva de la materia seca estimada para una velocidad de paso del 4% \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

Los resultados obtenidos en el patrón de fermentación ruminal (AGV) son consistentes con los reportados por Gameda & Hassen (2015) quienes mencionan que la reducción en los niveles de tanino en la dieta mejora la producción de AGV, algo observado en esta investigación. Los AGV de cadena ramificada se generan a partir de la degradación de algunos aminoácidos, y la concentración en cultivos *in vitro* puede usarse como un índice de degradación de proteínas (Molina-Alcaide et al., 2017). Los valores de los taninos condensados presentes en los forrajes evaluados en el presente estudio son más bajos que los reportados por Getachew et al. (2008) quienes mencionaron que con concentraciones de 20 g / kg de MS de taninos de Quebracho se obtuvo poco o ningún efecto sobre la producción de gas y la concentración de AGV total.

### 5.1.5. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este estudio, se puede concluir que el uso de especies forrajeras de clima tropical que contienen taninos en la dieta de los rumiantes tiene la capacidad de reducir la producción de gas y metano entérico (*C. arborea*; 2.54% CH<sub>4</sub>), sin embargo, esto a expensas de la reducción de la fermentación de MO en el rumen.

## 5.2. LEGUMINOSAS ARBÓREAS DE CLIMA TEMPLADO: EFECTO SOBRE LA MITIGACIÓN DE METANO ENTÉRICO Y FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO*

### 5.2.1. INTRODUCCIÓN

Las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), por parte de los rumiantes contribuyen al calentamiento y al cambio climático global (Bonilla-Cárdenas et al. 2012), y representan entre el 7 y el 18 por ciento de las emisiones totales de GEI a nivel mundial de origen antropogénico (IPCC 2006; FAO 2013). Entre los principales GEI identificados por organismos internacionales (Protocolo de Kyoto 1998) está el metano (CH<sub>4</sub>), bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), Hidrofluorocarbonos (HFC), Perfluorocarbonos (PFC), y Hexafluoruro de azufre (SF<sub>6</sub>).

El metano (CH<sub>4</sub>) es uno de los principales gases que se libera como producto final del metabolismo ruminal de especies vinculadas a la producción animal. Ku-Vera et al. (2018), reportaron valores de producción diaria de metano en vaquillas cruzas *B. taurus* x *B. indicus* de 88.08 g/vaquilla/día (18.9 min –150.1 máx.). En ovinos, Veerasamy et al. (2011) indican una producción de metano de 13.7 g/ovino/día.

En este sentido varios trabajos se han realizado en busca de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, principalmente de metano entérico (Animut et al. 2008; Hammond et al. 2016; Vanegas et al., 2016), sin embargo se debe considerar que en rumiantes existen varios factores que afectan la producción de metano entérico, como el tipo de población microbiana en el rumen, pH ruminal, relación acetato: propionato, raza de animal, consumo de materia seca, composición de la dieta, prácticas de manejo, estrés ambiental, entre otros (Veerasamy et al., 2011).

Por lo tanto, estrategias como la modificación de la población de animales rumiantes, procesos biotecnológicos para modificar los microorganismos metano génicos, y manipulación nutricional (Bonilla-Cárdenas, 2012) se han usado para mitigar la producción de metano entérico y alterar las diferentes causas relacionadas a la fermentación entérica.

En lo que respecta a la manipulación nutricional, trabajos realizados con especies vegetales ricas en metabolitos secundarios como *Acacia. angustissima*, *Sesbania. sesban*, *Leucaena leucocephala*, *Pennisetum.purpureum* y *Acacia. mearnsii* han sido utilizadas (Perna et al., 2017; Barros-Rodríguez et al., 2014; Soliva et al., 2008) por su potencial para reducir la producción de metano entérico, que por su contenido de taninos y saponinas han demostrado su efecto sobre la metanogénesis, la defaunación de microorganismos metano génicos y la no inhibición de la síntesis de proteína dietarias.

La disponibilidad de leguminosas arbóreas en cada país y su uso asociado con el pastoreo tradicional (Muir et al., 2014) resultaría ser un modelo a seguir como un sistema alternativo en la alimentación de rumiantes para contribuir en la reducción de emisiones de metano entérico al medio ambiente.

Estos hallazgos sustentan el objetivo de estudiar la capacidad de modulación ruminal por parte de leguminosas arbórea, considerando su especie, clima, contenido de metabolitos secundarios y su efecto sobre la función ruminal.

### 5.2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### Animales

Se utilizaron 4 ovejas Lacune ( $66.6 \pm 0.75$  kg de peso corporal; 4 años de edad) con cánula permanente en el rumen como donantes de contenido ruminal para las incubaciones *in vitro*. Los animales fueron cuidados y manejado por personal capacitado de acuerdo con las directrices españolas para la protección animal de acuerdo con la normativa europea, y los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Comunidad Autónoma de Madrid (Número de autorización PROEX 035/17). Los animales fueron alimentados con una dieta mixta que consistió de 600 g de heno de avena y 400 g de un concentrado comercial por kg (base de materia fresca). El concentrado consistió (g / kg, base de materia fresca) de 329 g de grano de cebada, 328 g de grano de maíz, 244 granos de trigo, 62 g de harina de soja, 28 g de  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , 6 g de sal y 2 g de mezcla mineral-vitamínica. La dieta mixta contenía 112, 350 y 166 g de proteína cruda (PC), fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD) por kg de MS, respectivamente, y se ofreció a 50 g de MS / kg de peso metabólico ( $\text{PV}^{0.75}$ ) en dos porciones iguales a las 09:00h y 17:00h. El consumo de agua fue a voluntad.

#### Colección de muestras.

Se utilizaron siete leguminosas arbóreas de clima templado de Ecuador situadas entre 2500 - 2800 msnm de altitud. Las muestras recolectadas fueron de *Acacia dealbatha*, *Acacia melanoxylon*, *Albizia lapantha*, *Lupinus pubescens*, *Inga insignes*, *Senna multiglandulosa* y *Tecoma stans*. Cada muestra recogida correspondió a las hojas verdes de cada planta, se recogieron aproximadamente 5 kg de hojas verdes, la cosecha se realizó durante los meses de febrero y marzo correspondiente a la época de lluvias. La humedad relativa del sector es de 55% - 60% y la precipitación media anual es de aproximadamente 1390 mm. Posteriormente las hojas se secaron en una estufa a 60 ° C durante 72 h. Se redujo el tamaño de la partícula usando un molino con un tamiz de 1 mm. Finalmente las muestras se almacenaron para su posterior análisis químico y ensayos *in vitro*.

#### Análisis químico

El contenido de materia seca (ID 934.01), ceniza (ID 942.05) y nitrógeno (ID 990.03) fueron analizados según la AOAC (1999). La fibra detergente neutra (NDF) y la fibra detergente ácida (ADF) se midieron secuencialmente utilizando la misma muestra en bolsas de filtro y se expresaron sin incluir ceniza residual según Van Soest et al. (1991), usando un analizador de fibra ANKOM220 (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, EE. UU). La FDN se determinó utilizando una amilasa termoestable. La lignina detergente ácida (LDA) se determinó por solubilización de celulosa con ácido sulfúrico (72%) de acuerdo con Van Soest et al. (1991). Los

fenoles totales (FT) se determinaron con el método Folin-Ciocalteu según Makkar (2003), y ácido tánico como patrón y los taninos condensados (TC) se midieron por el método de la vainillina ácido clorhídrico (Broadhurst y Jones 1978), usando catequina como patrón, utilizando un espectrofotómetro Hitachi U2000 UV VIS

Las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> se determinaron usando un espectrofotómetro de micro placas Epoch (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) por el método de fenol-hipoclorito (Weatherburn 1967). La producción de ácidos grasos volátiles (AGV) se determinaron mediante cromatografía de gases como lo describen Carro et al. (1992). El análisis de metano se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Martínez et al. (2010), utilizando un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC 14B; Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Alemania) equipado con un detector de ionización de llama y una columna cargada con Carboxen 1000 (Supelco, Madrid, España).

#### Incubaciones *in vitro*

El líquido ruminal para las incubaciones *in vitro* se obtuvo de cuatro ovejas inmediatamente antes de la alimentación de la mañana. Las incubaciones se realizaron utilizando el inóculo de cada oveja por separado, para obtener cuatro réplicas por tratamiento. Se utilizaron viales de vidrio (60 mL) en los que se pesaron 200 mg de materia seca de cada una de las muestras. El contenido ruminal extraído de cada animal se filtró a través de cuatro capas de gasa y se trasladó inmediatamente al laboratorio. El fluido ruminal se mezcló con un medio de cultivo descrito por Goering y Van Soest (1970) en una relación 1:4 (vol/vol) a 39°C bajo gaseado continuo con CO<sub>2</sub>, dosificándose 20 mL de la mezcla en cada vial mediante una bomba peristáltica (Watson-Marlow 520UIP31). Los viales se cerraron herméticamente y se incubaron a 39°C durante 120 horas. Adicionalmente se incluyeron viales sin sustrato (dos por inóculo) para corregir los valores de producción de gas de sustratos endógenos. La producción de gas se midió en cada vial a las 3, 6, 9, 12, 14, 22, 26, 30, 34, 48, 58, 72, 96 y 120 horas utilizando un transductor de presión (Delta Ohm DTP704-2BGI; Herter Instruments SL, Barcelona, España) el gas producido fue liberado después de cada medición. Los datos de producción de gas medidos en cada vial a cada tiempo de muestreo se ajustaron al modelo: mL gas =  $PG(1 + (B/t)^c) - 1$  descrita por Groot et al. (1996), donde PG: producción total de gas; B: asíntota de gas y c: velocidad de producción de gas.

Por otra parte, en los viales incubados a las 24 h se midió el gas producido y se tomó una muestra (10 mL) en un tubo de vacío (Terumo Europe N.V., Lovaina, Bélgica) para el análisis de metano. Las botellas fueron destapadas y el pH fue medido inmediatamente con un medidor de pH (Crison Basic 20; Crison Instruments, Barcelona, España). Para el análisis de AGV se tomó a este mismo tiempo, tres mililitros del contenido de los viales y se añadió 3 mL de solución desproteinizadora (20 g de ácido metafosfórico y 0.6 g de ácido crotónico por litro) y para determinar NH<sub>3</sub>-N se utilizó 2 mL de contenido más 2 mL de HCl 0.5 mol L<sup>-1</sup>. La digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca (DIVMS) fue medida utilizando un equipo DAYSII II (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, EE. UU) con muestras que fueron incubadas hasta las 120 horas. Cálculos y análisis estadísticos.



Para estimar los parámetros cinéticos de fermentación (datos no publicados excepto degradación efectiva de la materia seca) los datos de producción de gas se ajustaron al modelo exponencial:  $\text{gas} = A \{1 - \exp[-c(t - \text{lag})]\}$ , donde  $A$  es la asíntota de producción de gas,  $c$  es la tasa fraccional de producción de gas,  $\text{lag}$  es el retraso inicial en el inicio de la producción de gas y  $t$  es el tiempo de medición del gas. Los parámetros  $A$ ,  $c$  y  $\text{lag}$  fueron estimados por un procedimiento iterativo de mínimos cuadrados usando un proceso NLIN de SAS (versión 9.2, SAS Institute, Cary, NC, EE. UU) como lo describe Molina-Alcaide et al. (2017). El tiempo medio de producción de gas ( $T_{1/2}$ ) fue el tiempo (h) cuando la mitad del volumen de gas asintótico ( $A$ ; mL) se produjo y se calculó como  $T_{1/2} = [(\ln 2 / c) + \text{lag}]$ . La tasa promedio de producción de gas (AGPR; mL gas h<sup>-1</sup>) se definió como el promedio de la tasa de producción de gas entre el inicio de la incubación y  $T_{1/2}$ , y fue calculado como  $\text{AGPR} = Ac/[2(\ln 2 + c \times \text{lag})]$ . Finalmente, la degradabilidad efectiva de la materia seca (DEMS) se estimó asumiendo una tasa de pasaje ( $Kp$ ) de 0.04 por h de acuerdo con la ecuación:  $\text{DEMS} = [(DIVMS_{120} \times c) / (c + Kp)] e^{(-c \times \text{lag})}$ .

Los resultados obtenidos fueron analizados bajo un diseño completo al azar (DCA) mediante el paquete estadístico SAS (versión 9.2, SAS Institute, Cary, NC, EE. UU). Las curvas de producción de gas *in vitro* se obtuvieron mediante el programa Prism 4, Graphpad Software, Inc. De San Diego, CA, USA. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey al 5%. La relación entre el contenido de compuestos secundarios y los parámetros de producción de gas y metano fueron evaluados mediante un análisis de correlación simple usando el procedimiento PROC CORR del paquete estadístico SAS (versión 9.2, SAS Institute, Cary, NC, EE. UU).

### 5.2.3. RESULTADOS

#### Composición Química

En la tabla 7 se reporta la composición química de las leguminosas analizadas, donde se observa que *I. insignis* presentó el mayor contenido de materia seca (497.00 g/kg<sup>-1</sup>) con respecto a las otras especies. El rango de contenido de proteína cruda en todas las especies fue variable y se encontraba entre 134.66 – 238.45 g/kg<sup>-1</sup> MS, sin embargo, en *T. stans* el 53.28% de su proteína cruda estuvo ligada con la pared celular insoluble (fibra ácida detergente). El contenido de fibra neutro detergente muy superior en *I. insignis* con 647.65 g/kg<sup>-1</sup> MS, mientras tanto que *S. multiglandulosa* y *L. pubescens* presentaron un menor contenido de fibra ácido detergente (198.25 g/kg<sup>-1</sup> MS) y lignina ácido detergente (72.29 g/kg<sup>-1</sup> MS) respectivamente.

Por otro lado, el menor contenido de fenoles totales se encontró en *T. stans* (1.19%), finalmente *L. pubescens* presentó un 0.42% de taninos condensados, valor más bajo en comparación a las otras especies.

**Tabla 7.** Composición química de diferentes leguminosas arbóreas de clima templado expresado como g/kg<sup>-1</sup> de materia seca (excepto cuando se indique lo contrario)

|                     | <i>Acacia dealbatha</i> | <i>Acacia melanoxylon</i> | <i>Albizia lophanta</i> | <i>Lupinus pubescens</i> | <i>Inga insignis</i> | <i>Senna multi glandulosa</i> | <i>Tecoma stans</i> |
|---------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|-------------------------------|---------------------|
| MS <sup>1</sup>     | 484.00                  | 484.74                    | 457.23                  | 245.64                   | 497.00               | 336.64                        | 346.66              |
| MO                  | 933.12                  | 934.92                    | 934.94                  | 910.56                   | 908.00               | 846.75                        | 926.63              |
| Cenizas             | 66.93                   | 65.18                     | 65.13                   | 89.58                    | 92.00                | 153.38                        | 73.46               |
| PC                  | 162.32                  | 134.66                    | 141.87                  | 238.45                   | 176.85               | 162.95                        | 165.37              |
| PC-FAD(%)           | 34.86                   | 32.79                     | 21.98                   | 4.13                     | 40.43                | 4.64                          | 53.28               |
| FND                 | 519.88                  | 573.45                    | 329                     | 402.94                   | 647.65               | 275.92                        | 492.68              |
| FAD                 | 408.64                  | 406.90                    | 242.33                  | 221.15                   | 518.86               | 198.25                        | 368.00              |
| LAD                 | 285.00                  | 252.25                    | 145.54                  | 72.29                    | 311.29               | 117.12                        | 229.47              |
| LAD/FAD(%)          | 69.74                   | 61.99                     | 60.05                   | 32.77                    | 59.99                | 59.19                         | 62.43               |
| FT <sup>2</sup> (%) | 2.32                    | 1.95                      | 2.94                    | 1.73                     | 3.76                 | 1.69                          | 1.19                |
| TC <sup>3</sup> (%) | 1.24                    | 1.48                      | 2.18                    | 0.42                     | 3.45                 | 0.35                          | 1.15                |

MS: materia seca; <sup>1</sup> g/kg de materia fresca; MO: materia orgánica; PC: proteína cruda; PC-FAD: proteína cruda ligada a la fibra ácida detergente.; FND: fibra neutro detergente libre de cenizas; FAD: fibra ácido detergente libre de cenizas; LAD: lignina ácido detergente libre de cenizas; LAD/FAD: lignina en relación a la fibra ácida detergente; <sup>2</sup>FT: fenoles totales usando ácido tánico como patrón; <sup>3</sup>TC: taninos condensados usando catequina como patrón.

#### Producción de gas *in vitro* y metano entérico

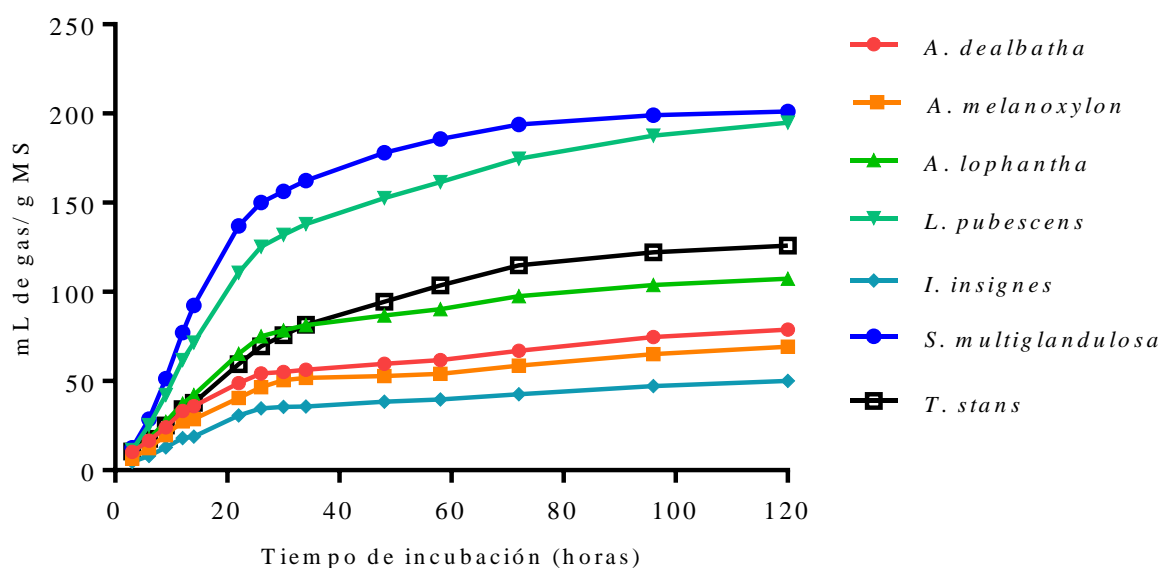
*I. insignis* presentó una menor producción de gas diferente estadísticamente ( $p=0.0001$ ) cuando fue comparada con las demás especies sometidas a fermentación *in vitro* (tabla 8). La asíntota de producción de gas y la tasa de fermentación fueron igual o mayor en todas las especies evaluadas. En la figura 24 se distingue grupos diferenciados con mayor y menor producción de gas.

Mientras que las especies que presentaron mayor potencial en la reducción de metano entérico producido fueron *I. insignis* y *A. melanoxylon* (1.09 y 1.35 mL CH<sub>4</sub>/g MS<sup>-1</sup> respectivamente). Adicionalmente, se evidenció una variación significativa ( $p=0.0001$ ) en el pH de los inóculos a las 24 horas de fermentación en un rango de 6.82 – 7.25

**Tabla 8.** Parámetros de producción de gas y metano entérico de leguminosas arbórea de clima templado

| Especie                   | Producción de gas  |                    |                     | Producción de metano |                                 |                                |
|---------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|----------------------|---------------------------------|--------------------------------|
|                           | PG                 | B                  | c                   | pH                   | mL CH <sub>4</sub> /g MS<br>24h | % CH <sub>4</sub><br>total 24h |
| <i>A. dealbatha</i>       | 84.3 <sup>d</sup>  | 19.5 <sup>ab</sup> | 1.220 <sup>b</sup>  | 7.23 <sup>a</sup>    | 1.76 <sup>bc</sup>              | 21.06                          |
| <i>A. melanoxylon</i>     | 70.4 <sup>e</sup>  | 17.3 <sup>b</sup>  | 1.390 <sup>b</sup>  | 7.25 <sup>a</sup>    | 1.35 <sup>c</sup>               | 15.56                          |
| <i>A. lophantha</i>       | 110.4 <sup>c</sup> | 17.9 <sup>ab</sup> | 1.540 <sup>ab</sup> | 7.07 <sup>b</sup>    | 1.86 <sup>bc</sup>              | 15.03                          |
| <i>L. pubescens</i>       | 201.9 <sup>a</sup> | 20.3 <sup>ab</sup> | 1.540 <sup>ab</sup> | 6.87 <sup>c</sup>    | 4.54 <sup>a</sup>               | 21.54                          |
| <i>I. insignes</i>        | 50.7 <sup>e</sup>  | 18.0 <sup>ab</sup> | 1.467 <sup>ab</sup> | 7.29 <sup>a</sup>    | 1.09 <sup>c</sup>               | 15.98                          |
| <i>S. multiglandulosa</i> | 204.4 <sup>a</sup> | 15.6 <sup>b</sup>  | 1.856 <sup>a</sup>  | 6.82 <sup>c</sup>    | 3.61 <sup>ba</sup>              | 15.61                          |
| <i>T. stans</i>           | 149.3 <sup>b</sup> | 30.5 <sup>a</sup>  | 1.322 <sup>b</sup>  | 7.02 <sup>b</sup>    | 2.56 <sup>abc</sup>             | 18.37                          |
| EEM                       | 5.51               | 2.79               | 0.09                | 0.025                | 0.45                            | 2.18                           |
| P-valor                   | <.001              | 0.024              | 0.004               | <.001                | <.002                           | 0.198                          |

PG: producción total de gas (mL/g MS); B: asíntota de gas (mL/g MS); y c: velocidad de producción de gas (%/hora). <sup>abc</sup> Los valores seguidos por diferente letra entre filas difieren significativamente (p<0.005).

**Fig. 24.** Curvas de producción de gas de leguminosas arbóreas sometidas a diferentes tiempos de incubación

### Perfil de ácidos grasos volátiles y función ruminal

La tabla 9, registra la proporción molar de ácidos grasos volátiles (%), donde *S. multiglandulosa* presentó 61.69, 29.51 y 4.72 para acetato, propianato y butirato respectivamente, porcentajes que difirieron significativamente ( $p=0.0001$ ) frente a las demás especies. De manera similar la mayor concentración de N-NH<sub>3</sub> fue para *S. multiglandulosa*. Sin embargo, la mayor DEMS y DIVMS fue para *I. insignes* con 381.28 y 791.46 g/kg respectivamente.

**Tabla 9.** Ácidos grasos volátiles (mol/100mol), nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub> mg/L), degradación efectiva de la materia seca (DEME g/kg<sup>-1</sup>) y digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS g/kg<sup>-1</sup>) de leguminosas arbóreas de clima templado

|                   | A.<br><i>dealbatha</i> | A.<br><i>melanoxylon</i> | A.<br><i>lopantha</i> | L.<br><i>pubescens</i> | I.<br><i>insignes</i> | S. multi<br><i>glandulosa</i> | T.<br><i>stans</i> | EEM   | P-valor |
|-------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------------|--------------------|-------|---------|
| Acetato           | 69.77 <sup>b</sup>     | 71.74 <sup>b</sup>       | 70.99 <sup>b</sup>    | 70.20 <sup>b</sup>     | 71.36 <sup>b</sup>    | 61.69 <sup>c</sup>            | 75.65 <sup>a</sup> | 0.77  | <0.001  |
| Propianato        | 20.63 <sup>b</sup>     | 21.53 <sup>b</sup>       | 22.77 <sup>b</sup>    | 21.87 <sup>b</sup>     | 17.45 <sup>c</sup>    | 29.51 <sup>a</sup>            | 16.36 <sup>c</sup> | 0.49  | <0.001  |
| Butirato          | 6.25 <sup>ba</sup>     | 4.31 <sup>c</sup>        | 4.37 <sup>c</sup>     | 5.37 <sup>bc</sup>     | 7.40 <sup>a</sup>     | 4.72 <sup>bc</sup>            | 5.73 <sup>bc</sup> | 0.35  | <0.001  |
| isobutirato       | 0.82 <sup>a</sup>      | 0.64 <sup>a</sup>        | 0.46 <sup>a</sup>     | 0.60 <sup>a</sup>      | 0.93 <sup>a</sup>     | 0.80 <sup>a</sup>             | 0.66 <sup>a</sup>  | 0.12  | 0.130   |
| isovalerato       | 1.32 <sup>ba</sup>     | 0.98 <sup>ba</sup>       | 0.69 <sup>b</sup>     | 1.11 <sup>ba</sup>     | 1.65 <sup>a</sup>     | 1.32 <sup>ba</sup>            | 0.90 <sup>b</sup>  | 0.15  | 0.004   |
| valerato          | 1.18 <sup>b</sup>      | 0.80 <sup>cb</sup>       | 0.70 <sup>c</sup>     | 0.84 <sup>cb</sup>     | 1.19 <sup>b</sup>     | 1.65 <sup>a</sup>             | 0.67 <sup>c</sup>  | 0.10  | <0.001  |
| A/P               | 3.38 <sup>b</sup>      | 3.33 <sup>b</sup>        | 3.11 <sup>b</sup>     | 3.20 <sup>b</sup>      | 4.12 <sup>a</sup>     | 2.11 <sup>c</sup>             | 4.64 <sup>a</sup>  | 0.12  | <0.001  |
| N-NH <sub>3</sub> | 133.65                 | 125.12                   | 115.70                | 128.53                 | 161.15                | 211.53                        | 109.88             | 26.29 | 0.146   |
| DMDE              | 339 <sup>ab</sup>      | 364 <sup>a</sup>         | 310 <sup>ab</sup>     | 173 <sup>c</sup>       | 381 <sup>a</sup>      | 232 <sup>bc</sup>             | 273 <sup>abc</sup> | 2.64  | <0.001  |
| DIVMS             | 749 <sup>ab</sup>      | 687 <sup>ab</sup>        | 661 <sup>b</sup>      | 477 <sup>c</sup>       | 792 <sup>a</sup>      | 470 <sup>c</sup>              | 699 <sup>ab</sup>  | 2.81  | <0.001  |

<sup>abc</sup> Los valores seguidos por distinta letra entre columnas son significativamente diferentes ( $p<0.05$ )

El análisis de correlación (tabla 10), indica una fuerte asociatividad entre el contenido de fenoles totales, taninos condensados y la producción de gas total ( $r= -0.664$ ,  $r=-0.813$ ) y metano entérico ( $r= -0.602$ ,  $r= -0.796$ ). Se observó una relación directa entre el contenido de compuestos secundarios y de degradación efectiva de la materia seca.

**Tabla 10.** Coeficientes de correlación de Pearson entre el contenido de compuestos secundarios y la producción de gas, metano y función ruminal de leguminosas arbóreas de clima templado

|    | Producción de gas |          | Producción de metano |          | Función Ruminal |          |                   |          |                    |          |
|----|-------------------|----------|----------------------|----------|-----------------|----------|-------------------|----------|--------------------|----------|
|    |                   |          |                      |          | pH              |          | N-NH <sub>3</sub> |          | DEMS <sub>4%</sub> |          |
|    | <i>r</i>          | <i>P</i> | <i>r</i>             | <i>P</i> | <i>r</i>        | <i>P</i> | <i>r</i>          | <i>P</i> | <i>r</i>           | <i>P</i> |
| FT | -0.664            | 0.104    | -0.602               | 0.153    | 0.051           | 0.913    | 0.097             | 0.836    | 0.616              | 0.141    |
| TC | -0.813            | 0.026    | -0.796               | 0.032    | -0.09           | 0.843    | -0.143            | 0.760    | 0.781              | 0.038    |

FT: fenoles totales; TC: taninos condensados

### 5.2.4. DISCUSIÓN

El contenido de materia seca está relacionado con la disponibilidad de nutrientes en la planta (McDonald et al. 2002), en este sentido *I. insignis*, *A. dealbatha*, *A. melanoxyton* y *A. lophanta* presentaron cantidades cercanas a los 500 g/kg MS<sup>-1</sup> lo que reflejaría aparentemente una biomasa superior disponible para el animal en comparación a las demás especies estudiadas.

Sin embargo, al analizar los componentes nutricionales se observó que en especies como *T. stans* e *I. insignes* a pesar de sus niveles aceptables de proteína cruda, un 53.28 y 40.43% de esa proteína respectivamente, se encontraban ligadas a la fibra ácida detergente, reduciendo así la disponibilidad de proteína para su degradación a nivel ruminal.

Por otra parte, si consideramos los componentes fibrosos de las plantas como predictores del consumo de materia seca Hernández-Orduño et al. (2015), indica que especies con elevados contenidos de lignina (LAD) como fue el caso de *I. insignes*, *A. dealbatha* y *A. melanoxyton* reducirían los niveles de consumo por parte de los animales y, por el contrario, se ha demostrado que existe una relación positiva entre la preferencia de consumo en los animales y el contenido de NDF ( $r = 0.737$ ;  $P < 0.0001$ ).

El contenido de compuestos secundarios (fenoles totales y taninos condensados) fue menor a lo reportado en otros estudios en leguminosas tropicales (Bhatta et al., 2012; Soltan et al., 2012; Oduguwa et al., 2013) debido a sus diferentes vías metabólicas (C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>) utilizadas para la fotorespiración (Archimède et al., 2011).

En lo que respecta a la cantidad de fenoles encontrados en esta investigación no representarían limitación alguna sobre parámetros de fermentación, porque a nivel ruminal los fenoles no tánicos no poseen la afinidad de ligarse con proteínas y otros nutrientes (Makkar 2003). Mientras tanto que los taninos poseen un mecanismo diferente de acción, siendo los hidrolizables más eficaces en la disminución de la metanogénesis al poseer un efecto directo sobre los microorganismos ruminales, inhibiendo su crecimiento. En esta investigación se determinó la cantidad de taninos condensados (entre 0.42 – 3.45%). Estos compuestos de baja toxicidad (Beauchemin et al., 2008), tienen un efecto indirecto, pero más evidente a nivel ruminal, ejerciendo su acción sobre nutrientes, disminuyendo la digestibilidad, producción de gas y metano (Gunjan y Makkar 2012). Además, aquellas arbustivas que tienen un mayor contenido de taninos condensados y proteína se relacionarían con una mayor disponibilidad para la formación de complejos tanino-proteínas (Hernández-Orduño et al. 2015), como fue el caso de *I. insignes* en esta investigación.

Sin embargo, se ha reportado también (Tavendale et al., 2005; Jayanegara et al., 2011) la acción de taninos condensados sobre los microorganismos ruminales como un proceso selectivo, actuando especialmente sobre la población de metanógenos ruminales, bacterias celulíticas y protozoos vinculados con la metanogénesis, causando una disminución en la disponibilidad de hidrógeno en el rumen, pudiendo afectar la hidrólisis, degradación de nutrientes y síntesis de proteína microbiana. McSweeney et al. (2001), relaciona estos efectos en función de la concentración y tipo

de taninos en el forraje y adaptación de la población ruminal, calificando de beneficioso el uso de forrajes ricos en taninos.

El contenido de taninos condensados encontrados en las leguminosas arbóreas se relacionó significativamente ( $p < 0.05$ ) con la producción de gas y metano entérico, resultados esperados como lo detalla Pellikaan et al. (2011), bajo este contexto se evidenció que a medida que la concentración de taninos condensados se incrementaba la producción de gas y metano disminuía. Sin embargo, la reducción de metano fue más marcada cuando fue calculado por unidad de nutriente ( $\text{mL/CH}_4/\text{g MS}$ ) en comparación al porcentaje total de metano producido a las 24 horas de incubación, comportamiento relacionado quizá al tipo de taninos (condensados o hidrolizables) como lo mencionan Gunjan y Makkar (2012) que también indica que al existir mayor número de grupos hidroxilos en los taninos condensados mayor será su potencial para reducir la producción de metano. En este sentido una menor producción de gas puede estar relacionada también a una mayor utilización de la proteína y síntesis de proteína microbiana (Blummel et al., 1997).

Los patrones de la cinética de fermentación (asíntota, tasa de fermentación) también fueron afectados por los niveles de taninos condensados debido quizá a la variabilidad en el contenido de carbohidratos (FAD) y lignina presente en las plantas (Galindo et al., 2009). Por otra parte, al contrario, con lo que menciona McDonald (2002) se observó que la mayor proporción molar de propionato no se relacionó con una disminución en la producción de metano, debido quizá más a la cantidad de taninos condensados presentes en las plantas y su actividad antimetanogénica en lugar de disminuir la digestibilidad de la fibra.

La degradación efectiva de la materia seca fue superior en aquellos forrajes con mayor contenido de taninos condensados, comportamiento similar a lo reportado por Barros-Rodríguez et al. (2015). Por otra parte, los taninos condensados disminuyeron (no significativamente) la concentración de  $\text{N-NH}_3$ , característica deseable hasta cierto punto según Batha et al. (2015), en este sentido Barros-Rodríguez et al. (2015) menciona que el  $\text{N-NH}_3$  forma parte del suministro de nutrientes para bacterias proteolíticas y celulolíticas. Además, Batha et al. (2015) indica que la presencia de taninos podría disminuir la concentración de amoníaco, exhibiendo el uso eficiente de ácidos grasos volátiles (AGV) para la síntesis de proteínas microbianas.

Los valores de digestibilidad fueron bajos en aquellas leguminosas con un menor contenido de taninos condensados (*S. multiglandulosa*) debiéndose en mayor medida al contenido de lignina que podría relacionarse con bajas tasas de reducción de tamaño de partícula y tasas de flujo de salida más lentas afectando al final al consumo (Hernández-Orduño et al. 2015).

### 5.2.5. CONCLUSIONES

Los efectos causados por metabolitos secundarios presentes en las leguminosas estudiadas sobre la producción metano entérico y cinética ruminal fueron diferentes, estando estos resultados condicionados al tipo y cantidad de compuestos secundarios presentes. Por otra parte, parece ser que los efectos perjudiciales sobre la digestibilidad estarían relacionados con el contenido de fibras indigestibles más que al contenido de taninos condensados.

### 5.3. EFICIENCIA DE *Acacia melanoxylon* EN DIETAS PARA OVINOS SOBRE LA REDUCCIÓN DE LA METANOGÉNESIS Y SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA

#### 5.3.1. INTRODUCCIÓN

La producción de ganado rumiante es una actividad pecuaria importante para el sustento de los pequeños agricultores en el mundo en desarrollo, ya que proporciona sustento a través de productos como la leche y la carne, la fuerza de trabajo animal para actividades agrícolas, el estiércol para la producción de cultivos y la energía de combustible, los ingresos en efectivo de las ventas de productos de origen animal y red de seguridad de los bienes de capital (Orskov, 1993).

Sin embargo, América Latina y el Caribe tienen el nivel más alto de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) (casi 1.3 giga toneladas) que se originan en actividades agrícolas, impulsadas por una importante producción de carne vacuna. Aunque a un ritmo reducido en los últimos años, el cambio continuo en el uso de la tierra también ha contribuido a las altas emisiones de GEI en la región, debido a la expansión tanto de los pastizales como de las tierras de cultivo para la producción de piensos (Napolitano et al, 2013).

En el Ecuador, predomina la utilización de monocultivos de gramíneas, en sistemas extensivos caracterizados por la utilización de carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa) (Muñoz-Espinoza et al., 2016) donde el pastoreo es la base de alimentación y la dependencia de los concentrados comerciales para la suplementación en el ganado bovino son las características principales de la región Sierra.

Consecuentemente es deseable desarrollar estrategias de alimentación para reducir la emisión de CH<sub>4</sub> entérico, para mitigar los efectos nocivos producidos en la atmósfera por estos gases. Las alternativas más viables parece ser la manipulación nutricional buscando dietas energéticamente eficientes y con metabolitos secundarios que module la fermentación en el rumen, y reduzca la producción variable de gases (especialmente metano) emitido a través del eructo (Carmona et al., 2009).

Con base en investigaciones previas donde se evaluaron varias leguminosa arbóreas y arbustivas de clima templado y tropical con diferentes contenidos de taninos condensados para la reducción de metano *in vitro*, el objetivo de esta investigación fue de evaluar a *A. melanoxylon* incluidas en dietas para ovinos sobre la mitigación de metano entérico en ovinos y síntesis de proteína microbiana.

### 5.3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### Ubicación del ensayo

El experimento se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. El clima en la región es frío templado, con una temperatura promedio de 14 ° C y una altitud de 2800 m

#### Tratamientos.

Se recolectaron hojas frescas de *Acacia melanoxylon* para su deshidratación y reducción de partícula. Una vez obtenida la harina de *Acacia melanoxylon* se elaboró tres dietas experimentales *iso*-energéticas e *iso*-protéicas con diferentes contenidos de *Acacia melanoxylon* (Tabla 11). Las dietas se elaboraron con base a requerimientos de proteína metabolizable (PM) y energía metabolizable (EM) según el AFRC. (1993).

**Tabla 11.** Composición química en base a materia seca de los tratamientos experimentales

| <i>Materias primas (%)</i> | <i>T0</i> | <i>T1</i> | <i>T2</i> |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Acacia negra               | 0,00      | 14,96     | 29,85     |
| Afrecho                    | 10,28     | 15,91     | 14,63     |
| Torta de soya              | 16,34     | 14,65     | 12,84     |
| Alfarina                   | 20,56     | 13,80     | 10,55     |
| Maíz                       | 45,56     | 29,50     | 17,51     |
| Melaza                     | 3,25      | 5,80      | 7,46      |
| Aceite de palma            | 2,71      | 4,53      | 6,17      |
| Sal común                  | 0,87      | 0,42      | 0,50      |
| vitaminas                  | 0,43      | 0,42      | 0,50      |
| <i>Aporte</i>              |           |           |           |
| PM (g/kg MS)               | 100.35    | 100.82    | 101.39    |
| EM (MJ /kg MS)             | 11.78     | 11.67     | 11.74     |
| MO                         | 962.45    | 954.27    | 950.50    |
| Cenizas                    | 37.55     | 45.73     | 49.50     |
| FND                        | 207.10    | 282.90    | 366.50    |
| FAD                        | 89.60     | 155.20    | 221.10    |

T0: tratamiento control; T1: Dieta + 15% de Acacia; T2: Dieta + 30 % de Acacia

PM: proteína metabolizable; EM: energía metabolizable; MO: materia orgánica.



### Animales experimentales

Se utilizó 18 ovinos cruza Dorset x Rambouillet con un peso inicial promedio de 18 kg que se alojaron en corrales individuales en el suelo con comederos y bebederos individuales, el alimento ofrecido fue controlado diariamente. El acceso al agua fue a voluntad. Antes del experimento, todos los animales fueron desparasitados con Ivermectina (Laboratorios Life, Quito-Ecuador, 1%; 1 ml por cada 50 kg de peso vivo) y se inyectaron con vitaminas ADE intramuscularmente (Laboratorios Life, Quito-Ecuador, 1 ml por cada 10 kg de peso vivo).

### Diseño experimental y tratamientos.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. El experimento se dividió en dos fases, la primera fase de 60 días de duración para la evaluación de consumo voluntario y comportamiento productivo. Y una segunda fase de 7 días para la evaluación de digestibilidad aparente de nutrientes.

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza utilizando un modelo lineal general de SAS. Las medias fueron comparadas por la prueba de Tukey. El análisis de todos los datos se realizó utilizando el paquete estadístico SAS (2002).

### Variables Respuesta.

#### Consumo voluntario de materia seca y ganancia de peso.

Los animales se alojaron en jaulas a nivel del suelo para medir individualmente el consumo voluntario de alimento. El consumo se estimó como la diferencia entre la cantidad de alimento ofrecido y el alimento restante después de 24 h, durante tres días consecutivos cada 15 días. Este procedimiento se realizó durante un período total de 60 días, y se obtuvieron muestras de alimento ofrecido y rechazado para su análisis proximal en laboratorio.

Los registros de peso se realizaron al mismo tiempo de la determinación del consumo voluntario utilizando una balanza electrónica marca Accurex modelo RX-150-S®

#### Digestibilidad aparente

Los animales se ubicaron en jaulas metabólicas individuales por 4 días que correspondieron a un periodo de adaptación para realizar pruebas de digestibilidad aparente de nutrientes. El periodo de colección de heces se realizó los posteriores cinco días. Para cada uno de los tratamientos se utilizó el método directo de colección total de heces. La producción de heces total por animal fue registrada y se tomó una muestra de 100 g que fue llevado a la estufa a 60°C por 72 horas (o hasta que alcanzaron un peso constante) para la determinación de materia seca. Todas las muestras de heces secas fueron molidas y tamizadas (1 mm) y etiquetadas para el análisis posterior de composición química proximal. Con base a los resultados obtenidos del análisis proximal de heces y forraje, se determinó el porcentaje de digestibilidad aparente de los nutrientes aplicando el método directo de digestibilidad descrito por Schneider & Flatt, (1975).

### Producción de orina y derivados de purina.

La producción diaria total de orina se recogió cada 24 h durante 5 días en un recipiente de plástico que contenía ácido sulfúrico al 10% para mantener el  $\text{pH} < 3$ , evitando así la volatilización del nitrógeno. Del volumen diario total, se obtuvo una muestra de 120 ml y se congeló a aproximadamente  $4^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis químico. Las muestras de orina se analizaron para determinar N-ureico, ácido úrico, alantoína, xantina y xantina + hipoxantina (Piñeiro-Vázquez et al., 2015).

La alantoína fue determinada por espectrofotometría por los procedimientos descritos por Chen & Gomes, (1992). La determinación del ácido úrico se llevó a cabo con la técnica propuesta por Fujihara et al, (1987). La síntesis de proteínas microbianas se estimó con la metodología propuesta por Chen & Gomes, (1992).

### Producción de metano

Los moles totales de  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  producidos se estimaron según la técnica de Wolin, (1960). El mol de hexosa fermentada en el rumen se calculó a partir del consumo de carbohidratos digestibles y el peso molecular de la hexosa (162). Para cada dieta, el consumo de carbohidratos digestibles (CCD) se estimó a partir del consumo de materia orgánica digestible (CMOD) y la digestibilidad de la materia orgánica *in situ* a las 24 h (DMO24h) como:  $\text{CCD} = \text{CMOD} \times \text{DMO24h}$ .

### Ácidos grasos volátiles

Para la determinación de ácidos grasos volátiles, al final del periodo experimental se tomaron directamente del rumen a través de una sonda gástrica 40 ml de líquido ruminal de cada animal. Las muestras se filtraron usando un paño para queso, se tomó una submuestra de 4 ml y se mezcló con 1 ml ácido metafosfórico al 25% y se mantuvo a  $4^{\circ}\text{C}$  para el posterior análisis de ácidos grasos volátiles (AGV).

### 5.3.3. RESULTADOS

**Tabla 12.** Comportamiento productivo, consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de ovinos alimentados con dietas con diferentes niveles de inclusión de *A. melanoxyton*.

|   | TRATAMIENTOS        |                      |                      | EEM   | P =    |
|---|---------------------|----------------------|----------------------|-------|--------|
|   | T0                  | T1                   | T2                   |       |        |
| Productivo                                  |                     |                      |                      |       |        |
| PV <sup>0.75</sup> (kg)                     | 7.192 <sup>a</sup>  | 11.896 <sup>a</sup>  | 11.600 <sup>a</sup>  | 1.37  | 0.050  |
| GPD (g/d)                                   | 95.43 <sup>b</sup>  | 147.90 <sup>a</sup>  | 141.33 <sup>ab</sup> | 13.42 | 0.029  |
| Consumo Voluntario ( g/kg MS)               |                     |                      |                      |       |        |
| MS  | 863.75 <sup>b</sup> | 1265.25 <sup>a</sup> | 1268.85 <sup>a</sup> | 57.77 | <.002  |
| MO  | 831.35 <sup>b</sup> | 1207.43 <sup>a</sup> | 1206.05 <sup>a</sup> | 55.10 | <.002  |
| FND   | 172.17 <sup>c</sup> | 341.60 <sup>b</sup>  | 442.00 <sup>a</sup>  | 17.30 | <.0001 |
| FAD   | 15.41 <sup>c</sup>  | 53,00 <sup>b</sup>   | 97.71 <sup>a</sup>   | 3,35  | <.0001 |
| Digestibilidad (g/kg MS)                    |                     |                      |                      |       |        |
| MS  | 441.80 <sup>a</sup> | 674.80 <sup>a</sup>  | 720.70 <sup>a</sup>  | 9.92  | 0.131  |
| MO  | 451.40 <sup>a</sup> | 684.20 <sup>a</sup>  | 755.30 <sup>a</sup>  | 10.13 | 0.147  |
| FND   | 339.20 <sup>b</sup> | 214.00 <sup>c</sup>  | 502.67 <sup>a</sup>  | 4.63  | <.002  |
| Consumo de nutrientes digestibles (g/kg MS) |                     |                      |                      |       |        |
| MS  | 424.90 <sup>b</sup> | 874.80 <sup>a</sup>  | 908.60 <sup>a</sup>  | 85.27 | 0.002  |
| MO  | 418.30 <sup>b</sup> | 846.30 <sup>a</sup>  | 869.50 <sup>a</sup>  | 83.87 | 0.003  |
| FND   | 30.22 <sup>c</sup>  | 120.63 <sup>b</sup>  | 218.88 <sup>a</sup>  | 13.32 | <.0001 |

<sup>a, b, c</sup>: Medias con la misma letra en una fila no difieren  $P > 0.05$ ; T0: dieta sin *A. melanoxyton*; T1: dieta con 15% de *A. melanoxyton*; T2: dieta con 30% de *A. melanoxyton* + 2% de enzimas fibrolíticas; PV<sup>0.75</sup>: Peso vivo metabólico; GPD: Ganancia diaria de peso; EEM: error estándar de la media.

En la tabla 12, se muestra el comportamiento productivo de los diferentes tratamientos. T1 y T2 fueron superiores estadísticamente ( $p=0.0288$ ) a T0 para la ganancia diaria de peso, a pesar de que el peso vivo metabólico no mostró diferencias significativas entre tratamientos.

El consumo voluntario de materia seca y materia orgánica fue superior en T1 y T2 ( $p=0.002$ ) al compararlas con T0. Mientras que el consumo voluntario de FDN y FDA fue mayor ( $p<.001$ ) para T2 (442.00 g/kg MS y 97.71 g/kg MS respectivamente) con respecto a T1 y T0.

Por otro lado, que el consumo de MS y MO digestibles mostraron diferencias significativas ( $p=0.001$  y  $p=0.003$  respectivamente) en T2 y T1 en comparación a T0, no obstante, sus valores de digestibilidad fueron iguales en todos los tratamientos.

Finalmente, el consumo de FND digestible, fue de 218.88 g/kg MS para T2 ( $p<.001$ ), mostrando una concordancia con su digestibilidad que tuvo un valor de 502.67 g/kg MS ( $p=0.002$ ), en los dos casos fueron superiores en relación a T0 y T1.

**Tabla 13.** Estimación del metano producido\* y ácidos grasos volátiles en líquido ruminal de ovinos alimentados con dietas con diferentes niveles de inclusión de *A. melanoxylo*n.

|                                      | TRATAMIENTOS        |                     |                     | EEM   | P=    | Contrastes |            |
|--------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------|-------|------------|------------|
|                                      | T0                  | T1                  | T2                  |       |       | Lineal     | Cuadrático |
| CCD (g/d)                            | 620.71 <sup>b</sup> | 846.29 <sup>a</sup> | 869.49 <sup>a</sup> | 34.87 | 0.002 | 0.0008     | 0.0507     |
| CH4 mol                              | 0.28                | 0.27                | 0.27                | 0.007 | 0.075 | 0.0504     | 0.0251     |
| CH4 mol/d                            | 2.20 <sup>b</sup>   | 2.92 <sup>a</sup>   | 3.03 <sup>a</sup>   | 0.12  | 0.004 | 0.0013     | 0.0957     |
| Energía perdida<br>como CH4 (%EB)    | 7.18                | 6.99                | 7.07                | 0.06  | 0.127 | 0.1525     | 0.0590     |
| pH rumen                             | 6.73                | 7.11                | 6.90                | 0.11  | 0.071 | 0.2562     | 0.0386     |
| Ácidos grasos volátiles (mol/100mol) |                     |                     |                     |       |       |            |            |
| Acético                              | 71.02               | 69.67               | 70.06               | 0.41  | 0.091 | 0.0570     | 0.0465     |
| Propiónico                           | 20.99               | 21.97               | 21.64               | 0.27  | 0.065 | 0.1004     | 0.0604     |
| Butírico                             | 3.89                | 3.83                | 3.77                | 0.11  | 0.774 | 0.4617     | 0.9950     |
| Relación A/P                         | 3.38 <sup>a</sup>   | 3.17 <sup>b</sup>   | 3.24 <sup>ab</sup>  | 0.05  | 0.034 | 0.0433     | 0.0257     |

<sup>a, b, c</sup>: Medias con la misma letra en una fila no difieren  $P > 0.05$ ; T0: dieta sin *A. melanoxylo*n; T1: dieta con 15% de *A. melanoxylo*n; T2: dieta con 30% de *A. melanoxylo*n + 2% de enzimas fibrolíticas; CCD: Consumo de carbohidratos digestibles; EEM: error estándar de la media. \* según (Wolin, 1960).

La producción de metano ruminal por día (tabla 13), fue menor ( $p=0.004$ ) para T0 (2.20 mol/d), en contraste a T1 y T2, este comportamiento tuvo relación con el menor consumo de carbohidratos digestibles que correspondió a este mismo tratamiento (T0=620.71 g/d) y que fue menor en comparación a T1 y T2 ( $p=0.002$ ). Sin embargo, no se encontró diferencias significativas en cuanto a las pérdidas de energía como metano ni cambios en el pH ruminal en los animales utilizados.

En lo que se refiere a la concentración de los AGV en el líquido ruminal recolectado, no se evidenció cambios en los diferentes tratamientos, pero si existió diferencias significativas ( $p=0.034$ ) en la relación acético: propiónico, al comparar T1 (3.17) con los demás tratamientos. Esta relación presentó una tendencia cuadrática en función a las inclusiones de *A. melanoxylon* en la dieta (0.026).

**Tabla 14.** Balance de nitrógeno y aporte de N-microbial en ovinos alimentados con dietas con diferentes niveles de inclusión de *A. melanoxylon*.

|                            | Tratamientos       |                    |                    | EEM  | P=     |
|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------|--------|
|                            | T0                 | T1                 | T2                 |      |        |
| Balance de nitrógeno (g/d) |                    |                    |                    |      |        |
| Consumo de N               | 16.05              | 16.13              | 16.22              | 3.37 | 0.765  |
| N en heces                 | 3.16               | 3.17               | 3.19               | 0.48 | 0.563  |
| N orina                    | 7.58 <sup>a</sup>  | 5.89 <sup>b</sup>  | 5.57 <sup>b</sup>  | 0.88 | 0.014  |
| Retención                  | 5.30 <sup>b</sup>  | 7.05 <sup>a</sup>  | 7.44 <sup>a</sup>  | 0.85 | < .001 |
| Derivados de purina (g/d)  |                    |                    |                    |      |        |
| Alantoína                  | 17.73 <sup>b</sup> | 24.75 <sup>a</sup> | 28.81 <sup>a</sup> | 0,46 | < .001 |
| Ácido úrico                | 9.70 <sup>a</sup>  | 10.54 <sup>a</sup> | 8.71 <sup>a</sup>  | 1.43 | 0.671  |
| Xan + Hi                   | 3.4                | 3.0                | 3.1                | 0.72 | 0.564  |
| Total                      | 30.83 <sup>b</sup> | 38.29 <sup>a</sup> | 40.62 <sup>a</sup> | 0.68 | < .001 |
| N microbial (g/día)        | 26.66 <sup>b</sup> | 33.12 <sup>a</sup> | 35.13 <sup>a</sup> | 1.76 | < .001 |

<sup>a, b</sup>: Medias con la misma letra en una fila no difieren  $P>0.05$ ; T0: dieta sin *A. melanoxylon*; T1: dieta con 15% de *A. melanoxylon*; T2: dieta con 30% de *A. melanoxylon* + 2% de enzimas fibrolíticas; Xan + Hi; xantina + hipoxantina. EEM: error estándar de la media.

En lo que se refiere al balance de nitrógeno (Tabla 14), se observa una disminución del contenido del N en orina de los animales correspondientes al tratamiento 1 y 2 (5.89 g/d y 5.57 g/d) y que difieren estadísticamente frente al tratamiento control ( $p=0.014$ ). Estos valores tienen relación con la retención diaria de nitrógeno, ya que estos mismos tratamientos (T1 y T2) son los que presentan los valores más altos ( $p<.001$ ) (7.44 g/d y 7.05 g/d respectivamente) en comparación con T0.

Por otro lado, los derivados de purina (alantoína, ácido úrico, xantina + hipoxantina) cuantificados en la orina se incrementaron en los animales que recibieron dietas con 15 % y 30 % de *A. melanoxyton* + enzimas fibrolíticas (40.62 g/d y 38.29 g/d) frente al tratamiento control (30.83 g/d) ( $p < .001$ ). Finalmente, el aporte de nitrógeno microbiano está en relación a la concentración de los derivados de purina, así pues, en T1 y T2 el aporte fue de 33.12 y 35.13 g/d respectivamente y superaron estadísticamente al tratamiento control ( $p < .001$ ).

### 5.3.4. DISCUSIÓN

Los efectos esperados de las dietas con inclusión 15 % y 30% de *A. melanoxyton* esperados sobre la reducción en la producción de metano no se observó. En este sentido la producción de metano (mol/día) se incrementó en función del contenido de *A. melanoxyton*, en la dieta comportamiento similar a los observado en ovinos pastoreando *P. purpureum* y suplementados con *L. leucocephala* (Barros-Rodriguez et al., 2015). En nuestro trabajo no se observó la acción de los taninos sobre la producción de metano, posiblemente a las bajas concentraciones de taninos condensados en *A. melanoxyton* (1.48%) frente a otros experimentos donde se determinó efectos anti nutricionales con niveles entre 5 – 9 % (Archimède et al., 2016; Pathirana, 2003; Rira et al., 2015), además la adición de enzimas fibrolíticas en el tratamiento 2 ayudó a que existan a nivel ruminal mayor cantidad de carbohidratos potencialmente fermentables para la producción de metano.

El contenido de FND y FAD, en las dietas con *A. melanoxyton* fueron más altas que el tratamiento control, valores relacionado al alto contenido de lignina que posee la *Acacia* 25,22 %. En este sentido Puchala et al., (2005) menciona que las leguminosas generalmente tienen concentraciones de lignina más altas que las gramíneas, esto estaría influenciando en la baja digestibilidad de la FDN (214.00 g/kg MS) observado en el T1, estos efectos se ven mejorados en T2 con la administración de enzimas fibrolíticas que mejoró la digestibilidad de FDN (502.67 g/kg MS;  $p = 0.002$ ). Este aumento en la digestibilidad de la FND lograría una adhesión más rápida por parte de los microorganismo al sustrato de fermentación (Bissi et al., 2018) un factor importante para la formación de biopelículas y el inicio de acciones enzimáticas microbianas sobre material fibroso (Edwards et al, 2007). Además el rendimiento de las enzimas fibrolíticas adicionadas en T2 se vio beneficiada por el valor del pH ruminal que se mantuvo en niveles ( $> 6.73$ ) que favoreció a una mayor actividad de las enzimas fibrolíticas (Adesogan et al, 2014).

Sin embargo, la producción de metano en T1 (2.92 mol/d) no fue diferente ( $p = 0.096$ ) a T2 (3.03 mol/d), tomando en cuenta que no existió la adición de enzimas y que la baja concentración del tanino condensado de *A. melanoxyton* no produjo los efectos esperados. En este contexto, la producción de metano proviene de sustratos rápidamente fermentables como es el caso del almidón que se encuentran en el maíz (Cabrita et al, 2011) y azúcares más fácilmente disponibles como la sacarosa encontradas en la melaza (Elias, 2000) que son fuentes energéticas importantes para los microorganismos ruminales.



En consumo voluntario de materia seca y materia orgánica no se vio afectado por la inclusión de *A. melanoxylon* ni por su contenido de taninos condensados. Por ejemplo, Addisu et al, (2016), con dietas con 5% de taninos condensados reportó disminución en el consumo voluntario, relacionando estos efectos a la habilidad de los taninos en formar complejos con las muco-proteínas salivares, formando precipitados insolubles, y reaccionando además con los receptores del gusto, provocando una sensación de astringencia, provocando una disminución en el consumo voluntario. En este sentido los niveles de inclusión (15 % y 30 % de *A. melanoxylon*, tampoco afectaron a la palatabilidad de la dieta. Por otra parte, los pesos moleculares para los taninos condensados van a estar de acuerdo al tipo de tanino y de la fuente donde se encuentren, para la mayoría de leguminosas el peso molecular esta entre 2000 y 4000 daltons, sin embargo se ha reportado pesos entre 5 800 y 13 200 daltons (Kumar & Singh, 1984). Sin embargo, se ha observado que la afinidad del tanino por la precipitación de proteínas aumenta regularmente en la serie polifenólica de aquellos con un peso molecular de 576 y aquellos con un peso molecular más allá de 1134 (Bate-Smith, 1973).

En lo que respecta al balance de nitrógeno y aporte de N microbiano (tabla 4), la excreción en las heces no fueron afectadas por la inclusión de *A. melanoxylon* ( $p=0.563$ ) quizá debido que no existió tampoco efectos sobre la digestibilidad de la materia orgánica, caso contrario a lo reportado por Silanikove et al, (1994) que utilizando *Ceratonia sliqua* con 5 % taninos condensados observó una disminución de la digestibilidad del alimento y sus efectos se observaron con el aumento de la excreción fecal de nitrógeno. Sin embargo hay que tener en cuenta que parte de esa proteína es de origen endógeno (Addisu, 2016).

Por otra parte, el N en orina se redujo con las dietas que contenían *A. melanoxylon* que a pesar de su bajo contenido en taninos tampoco afectó a las pérdidas de energía como metano, en este sentido Carulla et al., (2005) con la utilización de taninos 0.615 g/g por Kg de MS, provenientes de extractos de *A. mearnsii* reportó disminución de la excreción de nitrógeno urinario sin afectar la retención de energía, comportamiento similar encontrado en nuestro trabajo.

A pesar de consumir dietas con similar contenido de proteína metabolizable ( $T_0=100.35$ ;  $T_1=100.82$ ;  $T_2=101.39$  g/kg MS), el balance de nitrógeno presentó diferencias significativas ( $p<.001$ ). Estas diferencias pueden deberse principalmente por la reducción del contenido de N en la orina ( $p=0.014$ ) ya que no existió diferencias en la excreción de N fecal, esto podría estar explicado por la dependencia de la digestibilidad aparente del N en la cantidad de MO fermentable, y no en el contenido del nitrógeno en la dieta (Carulla et al., 2005).

La excreción urinaria de alantoína es un indicativo de la síntesis de proteínas microbianas y del consumo de materia seca. En este sentido, las concentraciones de alantoína se incrementaron en los tratamientos  $T_1$  y  $T_2$ , en comparación al control, relacionándolo con una mayor síntesis de proteína microbiana (Makkar y Chen 2004), provenientes de una mayor disponibilidad de sustratos fermentables, traducidos en un mayor consumo de materia seca (Dórea et al, 2017), como se observó en este experimento. La formación de complejos tanino-

proteína que en un nivel bajo pudo darse en este experimento pudo haber ayudado a la protección de proteínas dietarias. Este proceso se ve favorecido con un pH normal, además se reduce la producción de N-amoniaco y un mayor flujo de nitrógeno microbiano (Carulla et al., 2005; Puchala et al., 2005).

### 5.3.5. CONCLUSIONES

A pesar de que los niveles de taninos encontrados en *A. melanoxylon* presentaron un comportamiento *in vivo* diferentes a los reportados en el trabajo *in vitro*, se relacionaría a los diferentes factores medio ambientales, de manejo, de la dieta y propios del animal intervendrían como moduladores de la respuesta reportadas en el trabajo *in vivo* en esta investigación.



## 6. CONCLUSIONES FINALES

1. En la evaluación de varias leguminosas de clima tropical se evidenció marcadas diferencias entre las especies leguminosas arbóreas probadas en su tasa y grado de fermentación ruminal. La diferencia observada en la producción de metano entérico dentro de las arbustivas y la gran variación entre las especies estudiadas ofrecen la oportunidad de seleccionar especies con bajo potencial metanogénico y elevada cantidad de proteína como *C. arborea* y *F. macrophylla* para la alimentación de rumiantes.
2. Los efectos causados por metabolitos secundarios presentes en las leguminosas de clima frío sobre la producción metano entérico y cinética ruminal fueron diferentes, estando estos resultados condicionados al tipo y cantidad de compuestos secundarios presentes. Parece ser que los efectos perjudiciales sobre la digestibilidad estarían relacionados con el contenido de fibras indigestibles más que al contenido de taninos condensados.
3. Los resultados encontrados en los ensayos *in vivo*, fueron contrastantes a los reportados *in vitro*, lo que sugiere que los contenidos de taninos concentrados en *A. melanoxylon* se comportan de distinta manera sobre la modulación de las funciones del rumen, posiblemente a efectos relacionados a factores de los componentes de la dieta, medio ambientales y propios del animal



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abarghuei, M. J., Rouzbehan, Y., & Alipour, D. (2011). Effect of oak (*Quercus libani* Oliv.) leave tannin on ruminal fermentation of sheep. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13(SUPPL.), 1021–1032.
- Addisu, S. (2016). Effect of dietary tannin source feeds on ruminal fermentation and production of cattle ; a review. (March 2016).
- Adesogan, A. T., Ma, Z. X., Romero, J. J., & Arriola, K. G. (2014). Ruminant Nutrition Symposium : Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes 1. 1317–1330. <https://doi.org/10.2527/jas2013-7273>
- AFRC. (1993). Animal and Food Research Council. Energy and Protein requirements of ruminants. Wallingford, UK.: CAB International.
- AFRC. (1992). Technical committee on responses to nutrients. Rep. no. 9. Nutritive requirements of ruminant animals. Protein. In Nutrition Abstracts and Reviews (Series B) 62:787–835
- Agricultural and Food Research Council (1992) AFRC Technical Committee on responses to nutrients. Report no. 9. Nutritive requirements of ruminant animals: protein. Nutrition Abstracts and Reviews, Series B 62, 787–835.
- ARC., (1984). The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock, Suppl. No.1, Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough.
- AOAC (1999) Official Methods of Analysis, 16th edition, 5th revision. AOAC International, Gaithersburg, MD
- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A. L., Patra, A. K., Sahlu, T., Varel, V. H., & Wells, J. (2008). Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Animal Feed Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.10.014>
- Archimède, H., Eugène, M., Marie Magdeleine, C., Boval, M., Martin, C., Morgavi, D. P., ... Doreau, M. (2011). Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.003>
- Archimède, H., Rira, M., Barde, D. J., Labirin, F., Marie-Magdeleine, C., Calif, B., ... Doreau, M. (2016). Potential of tannin-rich plants, *Leucaena leucocephala*, *Glyricidia sepium* and *Manihot esculenta*, to reduce enteric methane emissions in sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. <https://doi.org/10.1111/jpn.12423>
- Argel, P., & Lascano, C. (1995). *Cratylia argentea* : Una nueva leguminosa arbustiva para suelos ácidos en zonas subhúmedas tropicales. In FAO (Ed.), *Conferencia Electrónica de la FAO sobre la "Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica"* (pp. 1–6).
- Bach, A., Calsamiglia, S., & Stern, D. (2015). Nitrogen Metabolism in the Rumen. *Journal of Dairy Science*, 88(E. Suppl.), E9–E21. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(84\)81409-5](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(84)81409-5)
- Barampama Z., and Simard R.E. Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans grown in Burundi. *Food Chem.* 1993; 47:159-167
- Barros-Rodríguez, M. A., Solorio-Sánchez, F. J., Sandoval-Castro, C. A., Klieve, A., Rojas-Herrera, R. A., Briceño-Poot, E. G., & Ku-Vera, J. C. (2015). Rumen function in vivo and in vitro in sheep fed *Leucaena leucocephala*. *Tropical Animal Health and Production*, 47(4), 757–764. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0790-y>
- Barros-Rodríguez MA, Solorio-Sánchez FJ, Sandoval-Castro CA, Ahmed AMM, Rojas-Herrera R, Briceño-Poot EG, Ku-Vera JC (2014) Effect of intake of diets containing tannins and saponins on in vitro gas production and sheep performance. *Animal Production Science* 54:1486-1489

- Barros-Rodríguez, M., Solorio-Sánchez, F., Ku-Vera, J. C., Ayala-Burgos, A. J., Sandoval-Castro, C., & Solís-Pérez G. (2012). Productive performance and urinary excretion of mimosine metabolites by hair sheep grazing in a silvopastoral system with high densities of *Leucaena leucocephala*. *Tropical Animal Health and Production*, 44, 1873–1878. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0150-0>
- Bhatta R, Saravanan, M, Baruah L and Sampath K.T (2012) Nutrient content, in vitro ruminal fermentation characteristics and methane reduction potential of tropical tannin-containing leaves. *J Sci Food Agric*.
- Bate-Smith, E. (1973). TANNINS. *Phytochemistry*, 12, 1809–1812.
- Bauman, D. E., & Griinari, J. M. (2003). NUTRITIONAL REGULATION OF MILK FAT SYNTHESIS. *Annual Review of Nutrition*, 23(1), 203–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.23.011702.073408>
- Beauchemin KA, Kreuzer M, O'Mara F and McAllister TA (2008) Nutritional management for enteric methane abatement: a review, *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48:21–27
- Bissi, L., Tilemahos, J., De, F., Sival, L., Vilas, Y. R., Ivo, P., ... Paulo, S. (2018). *Kinetic parameters of ruminal degradation in vitro with combinations of exogenous enzymes in diets of production systems simulated I Parâmetros cinéticos de degradação ruminal in vitro com combinações de enzimas exógenas em dietas de sistemas de produção*. 69–82.
- Bodas, R., Prieto, N., García-gonzález, R., Andrés, S., Giráldez, F. J., & López, S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites &. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1–4), 78–93. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010>
- Bonilla-Cárdenas J, Lemus-Flores C. Enteric methane emission by ruminants and its contribution to global climate change Review. *Rev Mex Cienc Pecu* 2012; 3(2):215-246
- Broadhurst, R. B., & Jones, W. T. (1978). Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(9), 788-794.
- Bryant, M.P., 1979. Microbial methane production—theoretical aspects. *J. Anim. Sci.* 48, 193–201.
- Blümmel, M, Makkar HPS, Becker K (1997) In vitro gas production: A technique revisited *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 77 (1):24-34
- Cabrita, A. R. J., Dewhurst, R. J., Melo, D. S. P., Moorby, J. M., & Fonseca, A. J. M. (2011). Effects of dietary protein concentration and balance of absorbable amino acids on productive responses of dairy cows fed corn silage-based diets. *Journal of Dairy Science*, 94(9), 4647–4656. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4097>
- Carmona, J., Bolívar, D., & Giraldo, L. (2009). El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias (Colombian Journal of Animal Science and Veterinary Medicine)*, 18(1), 49–63. Retrieved from <http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/view/6>
- Carulla, J. E., Kreuzer, M., Machmüller, A., & Hess, H. D. (2005). Supplementation of Acacia mearnsii tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*. <https://doi.org/10.1071/AR05022>
- Carro MD, Lebzien P and Rohr K (1992) Influence of yeast culture on the in vitro fermentation (Rusitec) of diets containing variable portions of concentrates. *Anim Feed Sci Technol* 37:209–220
- Chen, X. ., & Gomes, M. . (1992). Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of the technical details. *International Feed Resources Unit*, (January 1992), Occasional Publication. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.03.003>
- Church C.D. 1988. El Rumiante, Fisiología digestiva y nutrición. D'Mello. Editorial Acribia



- Delgado, D. C., González, R., Galindo, J., Cairo, J., & Almeida, M. I. (2007). Potencialidad de *Trichanthera gigantea* y *Morus alba* para reducir la producción ruminal de metano in vitro. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 41(4), 339–342.
- Devendra, C. (1990). Shrubs and tree fodders for farm animals. In C. Devendra (Ed.), *Animals*. Ottawa: IDRC.
- Dewhurst, R. J., Davies, D. R., & Merry, R. J. (2000). Microbial protein supply from the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 85(1–2), 1–21. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(00\)00139-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00139-5)
- Demeyer DI (1991) Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. In Jouany, J.P. (Ed.) *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*, INRA Editions, Paris. pp. 217-237.
- Díaz, A., Ranilla, M. J., Giraldo, L. A., Tejido, M. L., & Carro, M. D. (2015). Treatment of tropical forages with exogenous fibrolytic enzymes: Effects on chemical composition and in vitro rumen fermentation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. <https://doi.org/10.1111/jpn.12175>
- Dong, Y., Bae, H. D., McAllister, T. A., Mathison, G. W., & Cheng, K.-J. (1997). Lipid-induced depression of methane production and digestibility in the artificial rumen system (RUSITEC). *Canadian Journal of Animal Science*, 77(2), 269–278. <https://doi.org/10.4141/a96-078>
- Dórea, J. R. R., Danés, M. A. C., Zanton, G. I., & Armentano, L. E. (2017). Urinary purine derivatives as a tool to estimate dry matter intake in cattle : A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 100(11), 8977–8994. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12908>
- Edwards, J. E., Huws, S. A., Kim, E. J., & Kingston-smith, A. H. (2007). *Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen*. 62, 323–335. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00392.x>
- Egan, A. R., & Ulyatt, M. J. (1980). Quantitative digestion of fresh herbage by sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 94(01), 47. <https://doi.org/10.1017/s002185960002788x>
- Elias, A. (2000). Effects of the sources of energy on some of the final rumen fermentation products. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 34(4), 309–313.
- Espinoza de Pernía, N., & León Hernandez, W. J. (2002). Estudio anatómico del leño de 56 especies de la subfamilia Papilionoideae (Leguminosae) en Venezuela. *Revista Forestal Venezolana*, 46(1), 59–71.
- Eusebio, A. N., Shaw, J. C., Leffel, E. C., Lakshmanan, S., & Doetsch, R. N. (1959). Effect on Rumen Volatile Fatty Acids and Rumen Microbial Dissimilation of Glucose-C14 of Corn Meal when Fed Exclusively and in Combination with Hay or Certain Additives. *Journal of Dairy Science*, 42(4), 692–697. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(59\)90637-x](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(59)90637-x)
- FAO (Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2013) Mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero en la producción ganadera – Una revisión de las opciones técnicas para la reducción de las emisiones de gases diferentes al CO<sub>2</sub>. No. 177
- Fujihara, T., Orskov, E. R., Reeds, P. J., & Kyle, D. J. (1987). The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *The Journal of Agricultural Science*, 109(1), 7–12. <https://doi.org/10.1017/S0021859600080916>
- Galindo J, Marrero Y, Ruiz TE, González N, Díaz A, Aldama AI, Moreira O, Hernández JL, Torres V and Sarduy L (2009) Effect of a multiple mixture of herbaceous legumes and *Leucaena leucocephala* on the microbial population and fermentative products in the rumen of Zebu upgraded yearling steers. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 43:251-257

- Gaona, C. (2015). Redalyc.propiedades antimetanogénicas in vitro de algunas plantas adaptadas a las condiciones de sabana inundable del departamento de arauca, colombia.
- Gemeda, B. S., & Hassen, A. (2015). Effect of tannin and species variation on in vitro digestibility, gas, and methane production of tropical browse plants. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(2), 188–199. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0325>
- Gerber, P. J., Hristov, A. N., Henderson, B., Makkar, H., Oh, J., Lee, C., ... Oosting, S. (2013). Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: a review. *Animal*, 7, 2–220. <https://doi.org/10.1017/S1751731113000876>
- Getachew, G., Pittroff, W., Putnam, D. H., Dandekar, A., Goyal, S., & Depeters, E. J. (2008). *The influence of addition of gallic acid , tannic acid , or quebracho tannins to alfalfa hay on in vitro rumen fermentation and microbial protein synthesis*. 140, 444–461. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.03.011>
- Giraldo, L. A., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Carro, M. D., & Científico, A. (2008). Efecto de la sustitución de Brachiaria dictyoneura por acacia mangium sobre la fermentacion ruminal in vitro.
- Goering, H. K., & Van Soest, P. J. (1970). Forage fiber analysis. Agricultural handbook no. 379. *US Department of Agriculture, Washington, DC*, 1-20.
- Goel, G., & Makkar, H. P. (2012). Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical animal health and production*, 44(4), 729-739.
- Gunjan G and. Makkar HPS (2012) Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins *Trop Anim Health Prod* 44:729–739
- Groot JCJ, Cone JW, Williams BA, Debersaques FMA and Lantinga EA (1996) Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 64(1):77–89, [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01012-7](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01012-7)
- Harfoot, C. G. (1981). Lipid Metabolism in the Rumen. In W. W. Christie (Ed.), *LIPID METABOLISM IN THE RUMINANT ANIMALS* (p. 449). Retrieved from <https://books.google.es/books?id=LR2LBQAAQBAJ&lpg=PR4&hl=es&pg=PR4#v=onepage&q&f=false>
- Hammond KJ, Crompton LA, Bannink A, Dijkstra J, Yáñez-Ruiz DR, O’Kiely P, Kebreab E, Eugène MA, Yu Z, Shingfield KJ, Schwarm A, Hristov AN, Reynolds CK (2016) Review of current in vivo measurement techniques for quantifying enteric methane emission from ruminants. *Anim Feed Sci Technol* 219:13–30
- Hernández-Orduño G, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Capetillo-Leal CM, Aguilar-Caballero AJ, Alonso-Díaz MA (2015) A tannin-blocking agent does not modify the preference of sheep towards tannin-containing plants.
- Hess, H. D., Monsalve, L. M., Lascano, C. E., Carulla, J. E., Díaz, T. E., & Kreuzer, M. (2003). Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and Sapindus saponaria fruits: Effects on in vitro ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research*. <https://doi.org/10.1071/AR02241>
- Hobson, P., & Stewart, C. (1997). Rumen microbial ecosystem. In P. Hobson & C. Stewart (Eds.), *Chapman & Hall* (2da ed.). Retrieved from [http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203015/Referencias\\_para\\_lecciones\\_evaluativas/Unidad\\_4/Ecosistema\\_ruminal.pdf](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203015/Referencias_para_lecciones_evaluativas/Unidad_4/Ecosistema_ruminal.pdf)
- Hoover, W. H., & Stokes, S. R. (1991). Balancing Carbohydrates and Proteins for Optimum Rumen Microbial Yield. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3630–3644. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78553-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78553-6)
- Hussein L., Fattah M.A., Salem E. (1990). Characterization of Pure Proanthocyanidins Isolated from the Hulls of Faba Beans. (n.d.).

- INEC. Instituto de Estadística y Censo. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas/>
- IPCC (Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático) (2006). Capítulo 10: Emisiones resultantes de la gestión del ganado y del estiércol. En Directrices del IPCC de 2006 para los inventarios nacionales de gases de efecto invernadero. Volumen 4: Agricultura, silvicultura y otros usos de la tierra. pp 10.1–10.87
- Janssen, P. H. (2010). Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science and Technology*, 160(1-2), 1-22
- Jayanegara, A., Leiber, F., & Kreuzer, M. (2012). Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. 96, 365–375. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01172.x>
- Jayanegara A, Leiber F and Kreuzer M (2011) Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments, *Journal of Animal physiology and Animal nutrition*.
- Jouany, J.-P., & Morgavi, D. P. (2007). Use of ‘natural’ products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal*, 1(10), 1443–1466. <https://doi.org/10.1017/S1751731107000742>
- Johnson KA, Johnson DE. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci*, 1995; 73: 2483-2492
- Kamath, R. (2012). Flowers of India. Retrieved from Clitoria arborea website: [https://www.flowersofindia.net/catalog/slides/Butterfly Pea Tree.html](https://www.flowersofindia.net/catalog/slides/Butterfly%20Pea%20Tree.html)
- Krieg, J., Seifried, N., Steingass, H., & Rodehutschord, M. (2017). In situ and in vitro ruminal starch degradation of grains from different rye, triticale and barley genotypes. *Animal*, 11(10), 1745–1753. <https://doi.org/10.1017/s1751731117000337>
- Krishnamoorthy, U., Soller, H., Steingass, H., & Menke, K. H. (1991). A comparative study on rumen fermentation of energy supplements in vitro. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 65(1-5), 28-35.
- Kumar, R., & Singh, M. (1984). Tannins : Their Adverse Role in Ruminant Nutrition. 447–453.
- Ku-Vera, J. C., Valencia-Salazar, S. S., Piñeiro-Vázquez, A. T., Molina-Botero, I. C., Arroyave-Jaramillo, J., Montoya-Flores, M. D., ... & Escobar-Restrepo, C. S. (2018). Determination of methane yield in cattle fed tropical grasses as measured in open-circuit respiration chambers. *Agricultural and Forest Meteorology*, 258, 3-7.
- Leuning, R., Baker, S. K., Jamie, I. M., Hsu, C. H., Klein, L., Denmead, O. T., & Griffith, D. W. T. (1999). Methane emission from free-ranging sheep: A comparison of two measurement methods. *Atmospheric Environment*, 33(9), 1357–1365. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(98\)00365-3](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(98)00365-3)
- Lorenzo, P., Rodríguez-Echeverría, S. (2015). Cambios provocados en el suelo por la invasión de acacias australianas. *Ecosistemas* 24(1): 59-66. Doi.: 10.7818/ECOS.2015.24-1.10
- Martínez ME, Ranilla MJ, Tejido ML, Ramos S and Carro MD (2010) The effect of the diet fed to donor sheep on in vitro methane production and ruminal fermentation of diets of variable composition. *Anim Feed Sci Technol* 158:126–135
- Marquardt, R. R., & Campbell, L. D. (1973). Raw and autoclaved faba beans in chick diets. *Canadian Journal of Animal Science*, 1973, 53(4): 741-746, <https://doi.org/10.4141/cjas73-117>
- McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD and Morgan CA (2002) *Animal Nutrition*. 6th ed. (Prentice Hall: Harlow, England, UK)
- Makkar H., Siddhuraju P., Becker K. (2007). *Plant secondary metabolites*. Totowa, New Jersey: Humana Press, cop.. ISBN: 978-1-58829-993-2

- Makkar, H. P. S. (2003). Quantification of Tannins in Tree Foliage Quantification of Tannins in Tree Foliage.
- Makkar, H. P. S., & Mcsweeney, C. S. (2005). Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants (H. P. S. Makkar & C. S. Mcsweeney, Eds.). Netherlands: IAEA.
- Mbanzamihiho, L., Fievez, V., Da Costa Gomez, C., Piattoni, F., Carlier, L., Demeyer, D., & Gomez, D. C. (n.d.). *Methane emissions from the rumen of sheep fed a mixed grass-clover pasture at two fertilisation rates in early and late season 1*.
- McSweeney, C. S., Palmer, B., McNeill, D. M., & Krause, D. O. (2001). *Microbial interactions with tannins : nutritional consequences for ruminants*. 91, 83–93.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE). (2013). Sistema de Clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental. Subsecretaria de Patrimonio Natural. Quito
- Molina-Alcaide E, Carro MD, Rodela MY, Weisbjerg MR, Lind V, Novoa-Garrido M (2017) In vitro ruminal fermentation and methane production of different seaweed species. *Anim Feed Sci Technol* 228(1):1-12
- Molina Botero, C. I., Cantet, J. M., Montoya, S., Correa Londoño, G. a., & Barahona Rosales, R. (2013). Producción de metano in vitro de dos gramíneas tropicales solas y mezcladas con *Leucaena leucocephala* o *Gliricidia sepium*. *Revista CES Med Vet y Zoot*, 8(2), 15–31.
- Moss, A. R., Jouany, J.-P., & Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming.
- Mueller-Harvey, I. (2006). *Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health* ¶. 86(May 2006), 2010–2037. <https://doi.org/10.1002/jsfa>
- Muir JP, Pitman WD, Dubeux JC Jr, and Foster JL (2014) The future of warmseason, tropical and subtropical forage legumes in sustainable pastures and rangelands. *African Journal of Range & Forage Science*, 31:3, 187-198
- Muñoz-Espinoza, M., Artieda-Rojas, J., Espinoza-Vaca, S., Curay-Quispe, S., Pérez-Salinas, M., Núñez-Torres, O., ... Barros-Rodríguez, M. (2016). Sustainable farms: integration of agricultural systems. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 19, 93–99.
- Napolitano, G., Maximov, V., Holmes, J., Botts, F., & Tinazay, T. (2013). *A globAl Assessment of emissions And mitigAtion opportunities*.
- Oduguwa B, Olusoji A, Arigbede OM, & Adesunbola JO, & Sudekum KH (2013) Feeding potential of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) peles ensiled with *Leucaena leucocephala* and *Gliricidia sepium* assessed with West African dwarf goats. *Trop Anim Health Prod* 45:1363–368
- Orskov, E. R. (1994). Recent advances in understanding of microbial transformation in ruminants *Livestock Production Science* 39 (1994) 53-60
- Orskov, E. R. (1993). Reality in rural development aid: with emphasis on livestock. Aberdeen: Rowett Research Services Ltd.
- Ortiz L.T., Centeno C., y Treviño J. Tannins in faba bean seeds: effects on the digestion of protein and amino acids in growing chicks. *Animal Feed Science and Technology* 1993; 41:271-278
- Pal, K., Patra, A. K., Sahoo, A., & Kumawat, P. K. (2015). Evaluation of several tropical tree leaves for methane production potential, degradability and rumen fermentation in vitro. *Livestock Science*. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.07.011>
- Pathirana, T. K. (2003). *Forage tannins in ruminant nutrition*.
- Patra, Amlan K, & Saxena, A. J. (2009). Dietary phytochemicals as rumen modifiers : a review of the effects on microbial populations. 363–375. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9364-1>
- Patra, Amlan K, & Saxena, J. (2010). Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition Amlan K Patra a \* and Jyotisna Saxena b. (June 2010), 24–37. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4152>
- Patra, Amlan Kumar. (2012). Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: A synthesis of current research and future directions. *Environmental Monitoring and*

- Assessment*, 184(4), 1929–1952. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2090-y>
- Pellikaan WF, Stringano E, Leenaars J, Bongers D, Van Laar-van Schuppen S, Plant J, Mueller-Harvey I (2011) Evaluating effects of tannins on extent and rate of in vitro gas and CH<sub>4</sub> production using an automated pressure evaluation system (APES). *Anim Feed Sci Technol* 166–167: 377–390
- Perna Junior F, Cassiano ECO, Martins MF, Romero LAS, Zapata DCV, Pinedo LA, Marino CT, and Rodrigues PHM (2017) Effect of tannins-rich extract from *Acacia mearnsii* or monensin as feed additives on ruminal fermentation efficiency in cattle. *Livestock Science*
- Piñero-Vázquez, A., Canul-Solís, J., Alayón-Gamboa, J., Chay-Canul, A., Ayala-Burgos, A., Aguilar-Pérez, C., ... Ku-Vera, J. (2015). Potential of condensed tannins for the reduction of emissions of enteric methane and their effect on ruminant productivity Potencial de los taninos condensados para reducir las emisiones de metano entérico y sus efectos en producción de rumiantes. *Arch Med Vet*, 47, 263–272.
- Piñero-Vázquez, A. T., Canul-Solis, J. R., Alayón-Gamboa, J. A., Chay-Canul, A. J., Ayala-Burgos, A. J., Solorio-Sánchez, F. J., ... Ku-Vera, J. C. (2017). Energy utilization, nitrogen balance and microbial protein supply in cattle fed *Pennisetum purpureum* and condensed tannins. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(1), 159–169. <https://doi.org/10.1111/jpn.12436>
- Popova, M., Martin, C., Eugène, M., Mialon, M. M., Doreau, M., & Morgavi, D. P. (2011). Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic Archaea diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.060>
- Puchala, R., Min, B. R., Goetsch, A. L., & Sahlu, T. (2005). The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. *Journal of Animal Science*. <https://doi.org/10.2527/jas2014-7961>
- Relling, A., & Mattioli, G. (2008). Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 4(2), 34–40.
- Rira, M., Morgavi, D. P., Archimède, H., Marie-Magdeleine, C., Popova, M., Bousseboua, H., & Doreau, M. (2015). Potential of tannin-rich plants for modulating ruminal microbes and ruminal fermentation in sheep. *Journal of Animal Science*. <https://doi.org/10.2527/jas2014-7961>
- Rodríguez, R., Sosa, A., & Rodríguez, Y. (2007). La síntesis de proteína microbiana en el rumen y su importancia para los rumiantes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 41(4): 303–311, 2007. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 41(4), 303–311.
- Ruiz, R. & Ayala, R. 1987. Digestión y absorción de compuestos nitrogenados. En: R. Ruiz et al. (Eds.) *Bioquímica nutricional: Fisiología digestiva y metabolismo intermedia- rio en animales de granja*. Ed. EDICA. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. p. 189
- Russell, J.B., 2002. *Rumen Microbiology and its Role in Ruminant Nutrition*. J.B. Russell Publ. Co., Ithaca, NY, USA.
- Russell, J.B., Wallace, R.J., 1997. Energy-yielding and energy-consuming reactions. In: Hobson, P.N., Stewart, C.S. (Eds.), *The Rumen Microbial Ecosystem*, 2nd Edition. Blackie Academic and Professional. London, pp. 246±282.
- Santana, M. C. A., Fiorentini, G., Messana, J. D., Dian, P. H. M., Canesin, R. C., Reis, R. A., & Berchielli, T. T. (2017). Different forms and frequencies of soybean oil supplementation do not alter rumen fermentation in grazing heifers. *Animal Production Science*, 57(3), 530–538. <https://doi.org/10.1071/AN14608>
- Sejian Veerasamy, Lal Rattan, Lakritz Jeffrey, Ezeji Thaddeus. Measurement and prediction of enteric methane emission. *Int J Biometeorol* 2011; 55:1-16
- Silanikove, N., Nitsan, Z., & Perevolotsky, A. (1994). Effect of a Daily Supplementation of Polyethylene Glycol on Intake and Digestion of Tannin-Containing Leaves (*Ceratonia siliqua*)

- by Shhep. *J. Agric. Food Chem.*, 42(C1), 2844–2847.
- Schneider, B. H.; Flatt, W. P., 1975: The Evaluation of Feeds through Digestibility Experiments. The University of Georgia Press, Athens, pp. 423.
- Singh, G. P. ; Nagpal, A. K. ; Saini, N. (2005). Methane production in relation to productivity of livestock and environment. *Indian Journal of Animal Sciences*. Vol.75 No.1 pp.143-148
- Soliva, C. R., Zeleke, A. B., Clément, C., Hess, H. D., Fievez, V., & Kreuzer, M. (2008). In vitro screening of various tropical foliages, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.009>
- Soltan, Y. A., Morsy, A. S., Lucas, R. C., & Abdalla, A. L. (2016). Title: Potential of mimosine of *Leucaena leucocephala* for modulating ruminal nutrient degradability and methanogenesis. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.11.003>
- Soltan YA, Morsy AS, Sallam SMA, Louvandini H, and Abdalla AL (2012) Comparative in vitro evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 21:759–772
- Tavendale MH, Meagher LP, Pacheco D, Walker N, Attwood GT and Sivakumaran S (2005) Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis, *Anim Feed Sci Technol*, 123–124:403–419
- Tedeschi, L. O., Ramírez-Restrepo, C. A., & Muir, J. P. (n.d.). *Developing a conceptual model of possible benefits of condensed tannins for ruminant production*. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000974>
- Terrill, T. H., Rowan, A. M., Douglas, G. B., & Barry, T. N. (1992). Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrates meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58(3), 321–329. <http://doi.org/10.1002/jsfa.2740580306>
- Toral, P. G., Hervás, G., Missaoui, H., Andrés, S., Giráldez, F. J., Jellali, S., & Frutos, P. (2016). Effects of a tannin-rich legume (*Onobrychis viciifolia*) on in vitro ruminal biohydrogenation and fermentation. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14(1). <https://doi.org/10.5424/sjar/2016141-8989>
- Torres, A. J. F. J., Alonso, D. M. A., Hoste, H., Sandoval, C. C. A., & Aguilar, C. A. J. (2008). Positive and negative effects in goat production arising from the intake of tannin rich forage. *Trop Subtrop Agroecosyst*, 9, 83-90.
- Trópicos Ecuador Project. (2018). Missouri Botanical Garden. Retrieved from <http://serv.biokic.asu.edu/neotrop/plantae/checklists/checklist.php?clid=1&pid=1&dynclid=0>
- Trugo L.C. and Von Baer D. Analytical methods for the analysis of antinutritional factors in legume seeds. In: Jansman, G.D. et al. editors. Third international workshop on “Antinutritional factors in legume seeds and rapeseed” Wageningen Pers 1998 EAAP Publication N° 93. p. 11
- UICN. (2018). Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Retrieved from *Especies para restauración* website: [https://www.especiesrestauracion-uicn.org/data\\_especie.php?sp\\_name=Erythrina fusca](https://www.especiesrestauracion-uicn.org/data_especie.php?sp_name=Erythrina fusca)
- Ungerfeld, E. M., Rust, S. R., Burnett, R. J., Yokoyama, M. T., & Wang, J. K. (2005). Effects of two lipids on in vitro ruminal methane production. *Animal Feed Science and Technology*, 119(1–2), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.12.007>
- Ungerfeld, Emilio M. (2018). Inhibition of Rumen Methanogenesis and Ruminant Productivity: A Meta-Analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, 5(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00113>
- Valarezo, J., & Ochoa, D. (n.d.). *Rendimiento y valoración nutritiva de especies forrajeras arbustivas establecidas en bancos de proteína, en el sur de la Amazonía ecuatoriana*

- Performance and nutritional assessment of shrub forage species in the south of the Ecuadorian Amazon*. 113–124.
- Van Soest, C., & Demeyer, D. I. (1995). Lipolysis and Biohydrogenation of Soybean Oil in the Rumen In Vitro: Inhibition by Antimicrobials. *Journal of Dairy Science*, 78(12), 2797–2806. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(95\)76910-7](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(95)76910-7)
- Vanegas JL, Carro MD, Alvir MR and González J (2016) Protection of sunflower seed and sunflower meal protein with malic acid and heat: effects on in vitro ruminal fermentation and methane production. *J Sci Food Agric*, DOI 10.1002/jsfa.7743
- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant animal* (2nd ed.). Ithaca, US: Cornell University Press.
- Van Soest PJ, Robertson JB and Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74:3583–3597
- Veerasamy S, Rattan L, Jeffrey L, Thaddeus E (2011) Measurement and prediction of enteric methane emission. *Int J Biometeorol* 55:1-16
- Wang, M., Sun, X. Z., Janssen, P. H., Tang, S. X., & Tan, Z. L. (2014). Responses of methane production and fermentation pathways to the increased dissolved hydrogen concentration generated by eight substrates in in vitro ruminal cultures. *Animal Feed Science and Technology*, 194, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.04.012>
- Weatherburn MW (1967) Phenol–hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem* 39:971–974
- Wischer, G., Greiling, A. M., Boguhn, J., Steingass, H., Schollenberger, M., Hartung, K., & Rodehutschord, M. (2014). Effects of long-term supplementation of chestnut and valonea extracts on methane release, digestibility and nitrogen excretion in sheep. *Animal*, 8(6), 938–948. <https://doi.org/10.1017/s1751731114000639>
- Wolin, M. J. (1960). A Theoretical Rumen Fermentation Balance. *Journal of Dairy Science*, 43(10), 1452–1459. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(60\)90348-9](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(60)90348-9)
- Yildiz, S., Kaya, I., Unal, Y., Elmali, D. A., Kaya, S., Cenesiz, M., ... Oncuer, A. (2005). Digestion and body weight change in Tuj lambs receiving oak (*Quercus hartwissiana*) leaves with and without PEG. *Animal Feed Science and Technology*, 122(1–2), 159–172. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.005>